

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**OS EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DO  
BIOSILICATO<sup>®</sup>, UTILIZADOS INDEPENDENTEMENTE OU  
ASSOCIADOS, SOBRE O REPARO ÓSSEO EM RATAS  
OSTEOPÊNICAS.**

**RENAN FANGEL**

**SÃO CARLOS  
2009**

**RENAN FANGEL**

**OS EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DO  
BIOSILICATO<sup>®</sup>, UTILIZADOS INDEPENDENTEMENTE OU  
ASSOCIADOS, SOBRE O REPARO ÓSSEO EM RATAS  
OSTEOPÊNICAS.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Oishi**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto**

São Carlos  
2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F211el

Fangel, Renan.

Os efeitos do laser de baixa intensidade e do Biosilicato<sup>®</sup>, utilizados independentemente ou associados, sobre o reparo ósseo em ratas osteopênicas / Renan Fangel. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

135 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisioterapia. 2. Fototerapia. 3. Biomateriais. I. Título.

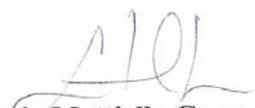
CDD: 615.82 (20<sup>a</sup>)

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE Renan Fangel, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 07 DE AGOSTO DE 2009.**

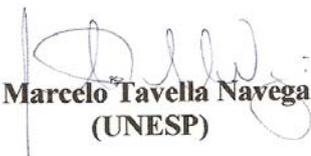
**BANCA EXAMINADORA:**



**Jorge Oishi  
(UFSCar)**



**Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa  
(UFSCar)**



**Marcelo Tavella Navega  
(UNESP)**

# **RENAN FANGEL**

## **ESTUDO 1**

**Título:** A associação do Biosilicato<sup>®</sup> e da Terapia Laser de Baixa Intensidade aumentou as propriedades biomecânicas, avaliadas em um Teste de Endentação, do calo ósseo de tíbias osteotomizadas em ratas osteopênicas.

## **ESTUDO 2**

**Título:** A ação do Biosilicato<sup>®</sup> e da Terapia Laser de Baixa Intensidade sobre as propriedades biomecânicas, avaliadas em um teste de Endentação e de Flexão a Três Pontos, de tíbias osteotomizadas em ratas osteopênicas.

A investigação foi conduzida no laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos sob orientação do Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto e no Laboratório de Neuroendocrinologia da Universidade Federal de São Carlos sob responsabilidade da Profa. Dra. Keico Okino Nonaka.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Eduardo e Ercínia, base de alicerce moral associado à ternura. Ensinaram o valor real dos sonhos fundamentados no trabalho, dedicação e humildade, que nos permite aproximar da verdade. Verdade que só pode ser atingida por Deus.

Ao meu irmão Leandro, exemplo eterno de honestidade, dignidade e compaixão. E a minha irmã, Andrea, exemplo de caridade, perseverança e dedicação familiar.

À Leticia, um grande amor que me ensinou a amar sem medo, a viver sem dor e a ser feliz.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Oishi, que me ensinou a beleza dos números e a verdadeira missão de um pesquisador, mas muito mais importante que isso, me ensinou a ser uma pessoa melhor por lapidar meu caráter e minha vocação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto que me iniciou na pesquisa científica, me ensinou a dar os primeiros passos e corrigiu meus primeiros erros. Demonstrou-me a beleza do conhecimento associado à simplicidade dos grandes homens.

À Prof. Dra. Patrícia Driusso, um dos grandes exemplos da minha vida, pela dedicação a felicidade, a resistência ao sofrimento, a grandeza de alma, e principalmente a delicadeza associada à força de uma grande mulher.

## **DEDICATÓRIA ESPECIAL**

À minha avó, Magdalena, “in memoriam”, por ter sido meu alicerce espiritual e personificar a bondade, a humildade, a sapiência, a resistência moral, física e espiritual. Se eu pudesse pedir uma única coisa a Deus, pediria para poder conversar com a minha avó e esclarecer dúvidas que talvez terei a minha vida inteira.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me ajudado a caminhar sem conhecer o percurso e a lutar pelos meus sonhos.

À minha família, pela compreensão às minhas ausências e aos meus erros.

À família Meda Vendrusculo, por me acolher como se fosse um filho.

Aos meus amigos de infância, Nelson, Guilherme, Paulo, Danilo, Rafael, Rodrigo, por me apoiar e me acompanhar durante toda a minha vida.

Aos membros da Banca, pelas sugestões e críticas que contribuíram ao aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, pelos ensinamentos práticos e teóricos que permitiram que a Fisioterapia se tornasse a minha profissão e vocação.

Ao meu grande amigo Paulo Sérgio Bossini, por ter me ajudado e contribuído a concretizar este trabalho, e principalmente por tornar se um dos meus melhores amigos.

Aos meus alunos de iniciação científica, Sama, Fernanda e Natália por terem me ajudado em todas as etapas desse trabalho e por terem contribuído a engrandecer este trabalho.

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, por permitir que eu realize os Testes Biomecânicos no laboratório de Neuroendocrinologia.

Ao Charles Chenwei Wang, aluno de Doutorado do Programa de Pós-graduação de Ciências Fisiológicas, por ter me ajudado a decidir e a realizar os Testes Biomecânicos de uma forma padronizada e bem planejada.

À Ana Cláudia Muniz Rennó e Renata Neves Granito, por me ajudar e orientar a superar os obstáculos de execução e planejamento.

Aos meus amigos do Laboratório de Eletrotermofototerapia, Davilene, Natália, Marco, Poliani, Vivian, Charles, Emiliano, Livia, Cleber, Jéssica, Elaine, Carla pelo carinho e pela troca de conhecimentos.

Aos meus amigos, Guilherme, Karina G., Karina N., Mariana, Giovanna, Paula, Ana Paula, Marê, Hueliton, pelos momentos de distração durante os dias de muito trabalho no laboratório.

Aos meus amigos de graduação que viveram essa experiência maravilhosa de se tornar um profissional de saúde.

Aos meus amigos da pós-graduação, por compartilharem este momento de dedicação profissional.

Aos funcionários da UFSCar, por me ajudarem em todos os momentos que eu precisei.

À CAPES pela ajuda financeira.

“Tu eras também uma pequena folha  
que tremia no meu peito.  
O vento da vida pôs-te ali.  
A princípio não te vi: não soube  
que ias comigo,  
até que as tuas raízes  
atravessaram o meu peito,  
se uniram aos fios do meu sangue,  
falaram pela minha boca,  
floresceram comigo.”

**Pablo Neruda**

## RESUMO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa densidade óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo com conseqüente aumento da fragilidade óssea. A osteopenia é caracterizada por apresentar uma menor densidade óssea que o tecido ósseo normal, mas maiores valores do que o tecido ósseo osteoporótico. A osteoporose e a osteopenia representam um grave problema de saúde a idosos e recentemente têm sido reconhecidos como um dos principais problemas de saúde pública, principalmente por aumentar o risco de fraturas. Neste contexto, há uma grande necessidade de se desenvolver tecnologias capazes de tratar fraturas em organismos osteoporóticos e osteopênicos. Existem diversos tratamentos promissores, como o uso do Biosilicato<sup>®</sup> e da terapia laser, os quais parecem induzir a osteogênese e estimulam o reparo ósseo. O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do Biosilicato<sup>®</sup> e da terapia laser sobre o reparo ósseo de ratas osteopênicas. Setenta ratas fêmeas da raça *Wistar* (12-semanas,  $\pm$  250g) foram ovariectomizadas e divididas em sete grupos com 10 animais em cada: controle padrão (CP), controle com defeito ósseo (CD), tratado com Biosilicato<sup>®</sup> (B), tratado com 60J/cm<sup>2</sup> (L60), tratado com 120J/cm<sup>2</sup> (L120), tratado com Biosilicato<sup>®</sup> e 60J/cm<sup>2</sup> (B+L60), tratado com Biosilicato<sup>®</sup> e 120J/cm<sup>2</sup> (B+L120). Sessenta dias após a ovariectomia, as tíbias foram osteotomizadas. Nos animais tratados com Biosilicato<sup>®</sup>, a cavidade do defeito ósseo foi preenchida com o biomaterial. Os animais foram irradiados com 830nm por sete sessões (48-48h). No décimo quarto dia após a osteotomia, as ratas foram sacrificadas e as tíbias dessecadas. As propriedades biomecânicas das tíbias esquerdas foram determinadas por dois testes: O Teste de Endentação com profundidade de 0-0,5mm, 0-1,0mm e 0-1,5mm que avaliou as propriedades biomecânicas do calo ósseo e o Teste de Flexão a Três Pontos que avaliou as propriedades biomecânicas das regiões ósseas integras do osso osteotomizado, sem considerar a região do calo ósseo que foi utilizada no teste de Endentação. A carga máxima (KN) e a energia de absorção (J) foram obtidas da curva de carga-deslocamento. A análise estatística foi realizada pelo Teste de Kruskal-Wallis e o Teste de Mann-Whitney U, com  $p \leq 0,05$ . Em relação ao Teste de Endentação, os grupos CP, B, B+L60 e B+L120 apresentaram maiores valores estatísticos ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo CD. A melhor resposta biomecânica do Teste de Endentação foi apresentada pelo grupo B+L120. Em relação à carga máxima do Teste de Flexão a Três Pontos, o grupo L60 apresentou maiores valores estatísticos ( $p \leq 0,05$ ) do que os grupos CP, B, L120, B+L60, B+L120 e todos os grupos tiveram valores semelhantes de energia de absorção. Pode-se concluir que a aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo e não alterou as propriedades das regiões ósseas integras. A terapia laser não promoveu diferença significativa das propriedades biomecânicas do calo ósseo e das regiões ósseas integras e a associação dos dois tratamentos com fluência de 120J/cm<sup>2</sup> promoveu um aumento das propriedades biomecânicas do calo ósseo a valores mais elevados do que o grupo que utilizou somente o biomaterial.

**Palavras Chaves:** Reparo Ósseo, Biomaterial, Terapia Laser de Baixa Intensidade, Propriedades Biomecânicas.

## ABSTRACT

Osteoporosis is generally a systematic skeletal disease characterized by low bone density and microarchitectural deterioration of bone tissue with a consequent increase in bone fragility. Osteopenia is characterised by a lower bone density than normal bone tissue but higher than osteoporotic bone tissue. Osteoporosis and osteopenia represent a severe health threat to elderly people and they have recently been recognised as a major public health problem. They are related with some clinic manifestations, mainly the increase of the fractures risk. In this context, there is a critical need to develop technologies able of treating osteoporotic and osteopenic fractures. Promising treatments are the use of biomaterials and the Low Level Laser Therapy (LLLT), which seem to induce osteogenesis and stimulate fracture healing. The aim of this study was to determine the effects of the Biosilicate<sup>®</sup> and the LLLT on bone consolidation of osteopenic rat. Seventy female Wistar rats (12 weeks-old,  $\pm$  250g) ovariectomy (OVX) was carried on. The animals were randomly divided into 7 groups, with 10 animals each: standard control (CP); defect bone control (CD), bone defect treated with Biosilicate<sup>®</sup> (B), bone defect treated with laser 60J/cm<sup>2</sup> (L60), bone defect treated with laser 120J/cm<sup>2</sup> (L120), bone defect treated with both treatments Biosilicate<sup>®</sup> and laser 60J/cm<sup>2</sup> (B+L60), bone defect treated with both treatments Biosilicate<sup>®</sup> and laser 120J/cm<sup>2</sup> (B+L120). Sixty days post-OVX the osteotomies were surgically performed on the left tibia. In the Biosilicate<sup>®</sup> treated animals, the cavities were carefully filled with the biomaterial. An 830nm laser was performed for seven sessions. On day 14 post-osteotomy, rats were sacrificed and the tibias were defleshed. Biomechanical properties of the tibia were determined by two tests: the Indentation Test to a depth of 0-0.5mm, 0-1.0mm and 0-1.5mm and the Three-Point Bending Test. From de load-deformation curve, the maximal load (KN) and energy absorption (J) were obtained. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis Test and Mann-Whitney U Test, with the level of significance of 5% ( $p \leq 0.05$ ). In relation to biomechanical properties of the Indentation Test, the groups CP, B, B+L60 and B+L120 presented higher statistically values ( $p \leq 0.05$ ) in relation to group CD. The better biomechanical answer among the groups was present by the group with Biosilicate<sup>®</sup> utilization in association of 120J/cm<sup>2</sup>. In relation to maximal load of the Three-Point Bending Test, the group L60 presented higher statistically values ( $p \leq 0.05$ ) in relation to group CP, B, L120, B+L60, B+L120 and the groups had similar values of absorption energy. The Biosilicate<sup>®</sup> application raised the biomechanical properties of the callus bone, but didn't raise the biomechanical properties of the tibia determined by Three-Point Bending Test. In the two biomechanical tests, the groups with treatment based only on laser irradiation haven't presented significant results in relation to group control fracture. The bones defects treated with both treatments Biosilicate<sup>®</sup> and laser 120J/cm<sup>2</sup> presented higher biomechanical properties of the callus bone in relation to the group based only Biosilicate<sup>®</sup> application.

**Keywords:** Fracture Healing, Biomaterial, Low Level Laser Therapy, Biomechanical Properties.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Al	=Alumínio
ALP	=Atividade Fosfatase Alcalina
As	=Arseneto
ATP	=Trifosfato de Adenosina
B	=Biosilicato <sup>®</sup>
B+L60	=Biosilicato <sup>®</sup> + Laser com 60J/cm <sup>2</sup>
B+L120	=Biosilicato <sup>®</sup> + Laser com 120J/cm <sup>2</sup>
BMP	=Proteína Morfogenética Óssea
BMP-2	=Proteína Morfogenética Óssea 2
BMP-4	=Proteína Morfogenética Óssea 4
BSP	=Sialoproteína
C	=Celsius
Ca	=Cálcio
CD	=Controle Defeito Ósseo
$\lambda$	=Comprimento de onda
cm	=Centímetro
cm <sup>2</sup>	=Centímetro Quadrado
COX	=Ciclo-Oxigenase
COX-1	=Ciclo-Oxigenase-1
COX-2	=Ciclo-Oxigenase-2
CP	=Controle Padrão
DNA	=Ácido Desoxirribonucléico
Dr.	=Doutor
Dra.	=Doutora

EP =Erro Padrão  
EPM =Erro Padrão da Média  
g =Gramma  
Ga =Gálio  
h =Hora  
H<sup>+</sup> =Íon de Hidrogênio  
H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> Hidrônio  
HA =Hidroxiapatita  
HCA =Hidroxicarbonoapatita  
He =Hélio  
HeNe =Hélio-Neônio  
Hz =Hertz  
HSP =Proteínas de Choque de Calor  
HSP27 =Proteínas de Choque de Calor 27  
J =Joules  
J/cm<sup>2</sup> =Joules por Centímetro Quadrado  
K =Quilo  
KCl =Cloreto de Potássio  
Kg =Quilograma  
KN =Quilo Newton  
L60 =Laser com 60J/cm<sup>2</sup>  
L120 =Laser com 120J/cm<sup>2</sup>  
L1 = Vértebra Lombar 1  
LaMav =Laboratório de Materiais Vítreos  
LLLT =Terapia Laser de Baixa Intensidade  
≤ =Menor ou Igual

M	=Média
MCM-3	=Gene da Manutenção Minicromossômica
mg	=Miligrama
mm	=Milímetro
mm/min	=Milímetro por minuto
μm	=Micrometro
Na <sub>2</sub> O-CaO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -SiO <sub>2</sub>	=Composto Geral dos Biovidros
NE	=Neônio
nm	=Nanômetro
NO	=Óxido Nítrico
O	=Oxigênio
OC	=Osteocalcina
OH <sup>-</sup>	=Hidroxila
OPN	=Osteopontina
OVX	=Ovariectomia
P	=Fósforo
%	=Porcentagem
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> - Na <sub>2</sub> O- CaO- SiO <sub>2</sub>	=Composto do Biosilicato <sup>®</sup>
Prof.	=Professor
Profa.	=Professora
RNA	=Ácido Ribonucléico
rpm	=Rotação por Minuto
s	=Segundos
Si	=Silício
SLRP	=Proteoglicanas Ricas em Pequenas Leucinas
T8	=Vértebra Torácica 8
T12	=Vértebra Torácica 12

TGF- $\beta$ 1 =Fator de Crescimento e Transformação- $\beta$ 1

UFSCar =Universidade Federal de São Carlos

USP =Universidade de São Paulo

VEGF =Fator de Crescimento Endotelial Vascular

vs =Versus

W =Watts

W/cm<sup>2</sup> =Watts por Centímetro Quadrado

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Procedimento de Ovariectomia: A- Tricotomia digital, B- Incisão cutânea, C- Incisão abdominal para a retirada de ambos os ovários, D- Sutura da região operada.....	35
<b>Figura 2</b> - Procedimento de Osteotomia: A- Tricotomia digital, B- Incisão na região tibial, C- Osteotomia, D- Sutura da região operada.	36
<b>Figura 3</b> - Tratamento com o Biosilicato <sup>®</sup> : A- Biosilicato <sup>®</sup> , B Aplicação do Biosilicato <sup>®</sup> .....	37
<b>Figura 4</b> - Tratamento Laser: A- Equipamento Laser, B- Irradiação.....	38
<b>Figura 5</b> - Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444).....	39
<b>Figura 6</b> - Teste de Endentação: A- Suporte do teste, B – Tíbia fixa pelo suporte.....	40
<b>Figura 7</b> - Teste de Endentação.....	40
<b>Figura 8</b> - Gráfico do Teste de Endentação: Curva Força-Penetração.....	41

<b>Figura 9</b> - Teste de Flexão a Três Pontos: A- Suporte, B – Osso fixo pela pré-carga.....	42
<b>Figura 10</b> - Gráfico do Teste de Flexão a Três Pontos.....	42
<b>Figura 11</b> - Desenho do Teste de Endentação.....	56
<b>Figura 12</b> - Variação da carga máxima do Teste de Endentação de 0,5mm, $p \leq 0,05$ , * vs grupo CD, + vs grupo B+L120, a vs grupo L60, b vs grupo B+L60.....	58
<b>Figura 13</b> - Variação da energia de absorção ou resistência do Teste de Endentação de 0,5mm, $p \leq 0,05$ , * vs grupo CD, + vs grupo B+L120, a vs grupo L60, b vs grupo B+L60.....	58
<b>Figura 14</b> - Variação da carga máxima do Teste de Endentação de 1,0mm, $p \leq 0,05$ , * vs grupo CD, + vs grupo B+L120.....	59
<b>Figura 15</b> - Variação da energia de absorção ou resistência do Teste de Endentação de 1,0mm, $p \leq 0,05$ , * vs grupo CD, + vs grupo B+L120, b vs grupo B+L60.....	60
<b>Figura 16</b> - Desenho do Teste de Endentação.....	73

<b>Figura 17</b> - Desenho do Teste de Flexão a Três Pontos.....	74
<b>Figura 18</b> - Variação da carga máxima do Teste de Endentação, $p \leq 0,05$ , * vs grupo CD, + vs grupo B+L120.....	75
<b>Figura 19</b> - Variação da energia de absorção ou resistência do Teste de Endentação, $p \leq 0,05$ , * vs grupo CD, + vs grupo B+L120...	76
<b>Figura 20</b> - Variação da carga máxima do Teste de Flexão a Três Pontos, $p \leq 0,05$ , * vs grupo L60, + vs grupo B+L120.....	77
<b>Figura 21</b> - Variação da energia de absorção ou resistência do Teste de Flexão a Três Pontos.....	77
<b>Figure 1. (Apêndice A)</b> - Change in the maximal load of the Indentation Test 0.5mm depth, $p \leq 0.05$ , * vs group 2, + vs group 7, a vs group 4, b vs group 6.....	118
<b>Figure 2. (Apêndice A)</b> - Change in the energy's absorption from Indentation Test 0.5mm, $p \leq 0.05$ , * vs group 2, + vs group 7, a vs group 4, b vs group 6.....	118
<b>Figure 3. (Apêndice A)</b> - Change in the energy's absorption from Indentation Test 1.0mm, $p \leq 0.05$ , * vs group 2, + vs group 7.....	119

**Figure 4. (Apêndice A)** - Change in the energy's absorption from Indentation Test 1.0mm,  $p \leq 0.05$ , \* vs group 2, + vs group 7, b vs group 6..... 119

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Dados Descritivos.....	125
Tabela 2- Dados Biomecânicos do Estudo 1.....	128
Tabela 3 - Dados Biomecânicos do Estudo 2.....	131

# SUMÁRIO

## 1. Parte 1

---

1.1 Contextualização – Justificativa.....	26
1.2 Objetivo.....	32
1.3 Método.....	32
1.3.1 Animais de Experimentação.....	32
1.3.2 Delineamento Experimental.....	32
1.3.3 Técnica Operatória.....	34
1.3.3.1 Ovariectomia.....	34
1.3.3.2 Osteotomia.....	35
1.3.4 Tratamento.....	36
1.3.4.1 Biomaterial.....	36
1.3.4.2 Laser.....	37
1.3.5 Sacrifício dos Animais.....	38
1.3.6 Coleta da Amostra.....	38
1.3.7 Análise Biomecânica.....	38
1.3.7.1 Teste de Endentação.....	39
1.3.7.2 Teste de Flexão a Três Pontos.....	41
1.3.7.3 Parâmetros Avaliados.....	43
1.3.8 Formas de Análise dos Resultados.....	43
1.4 Referências.....	43

## 2. Parte 2

---

2.1 Contextualização do Estudo 1.....	51
2.2 Estudo 1.....	51
2.2.1 Introdução.....	52
2.2.2 Materiais e Métodos.....	54
2.2.2.1 Procedimento Operatório de Ovariectomia.....	55
2.2.2.2- Procedimento Operatório de Osteotomia.....	55
2.2.2.3 Teste Biomecânico.....	55
2.2.2.4 Análise Estatística.....	57
2.2.3 Resultados.....	57
2.2.4 Discussão.....	60
2.2.5 Referências.....	63
2.3 Contextualização do Estudo 2.....	67
2.4 Estudo 2.....	68
2.4.1 Introdução.....	69
2.4.2 Materiais e Métodos.....	71
2.4.2.1 Procedimento Operatório de Ovariectomia.....	71
2.4.2.2 Procedimento Operatório de Osteotomia.....	72
2.4.2.3 Teste Biomecânico.....	72
2.4.2.4 Análise Estatística.....	74
2.4.3 Resultados.....	74
2.4.4 Discussão.....	78
2.4.5 Referências.....	82

### **3. Parte 3**

---

3.1 Discussão Geral.....	88
3.2 Conclusão Geral.....	103
3.3 Considerações Finais.....	103
3.4 Referências.....	104

### **4. Apêndices**

---

Apêndice A – Artigo Científico.....	111
Apêndice B – Tabela 1 - Dados Descritivos.....	124
Apêndice C – Tabela 2- Dados Biomecânicos do Estudo 1.....	127
Apêndice D – Tabela 3 - Dados Biomecânicos do Estudo 2.....	130

### **5. Anexos**

---

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética.....	134
---	-----

**1- PRIMEIRA PARTE**

## 1- PRIMEIRA PARTE

### 1.1- CONTEXTUALIZAÇÃO/ JUSTIFICATIVA

A osteoporose, doença esquelética sistêmica, é caracterizada pela diminuição da densidade do tecido ósseo, deteriorização da microarquitetura óssea e um conseqüente aumento da fragilidade óssea (MORRI; GENANT, 1998; PINTO NETO *et al.*, 2002; AMADEI *et al.*, 2006).

A osteopenia é definida como uma pequena diminuição da densidade do tecido ósseo e apresenta valores inferiores ao osso normal e superiores aos apresentados pelos ossos osteoporóticos. O teste de densidade mineral óssea é um teste clínico que tem como finalidade identificar diminuições da densidade óssea. A osteopenia é definida por valores abaixo de 1 e acima de 2,5 de diminuição de desvios padrões abaixo da média normal apresentada por jovens adultos e a osteoporose por valores abaixo 2,5 de diminuição. A osteopenia pode ser referida como o início do processo osteoporótico (JOHNEEL; KANIS, 2005; PASCO *et al.*, 2006).

A osteoporose e a osteopenia são caracterizadas por uma patofisiologia multifatorial, com diversos fatores de riscos, entre esses pode se citar: alterações hormonais (deficiência estrogênica, deficiência androgênica, aumento dos hormônios paratireóides, tireóides ou corticoesteróides) (GIROTRA; RUBIN; BILEZIKIAN, 2006; LEWIECKI; SILVERMAN, 2006; COMPSTON *et al.*, 2009), déficits alimentares (deficiência de cálcio, flúor, vitamina D, fósforo e proteínas) (MELLO; GOMIDE, 2005; LEWIECKI; SILVERMAN, 2006; JAVAID; HOLT, 2008), ingestão de álcool (PINTO NETO *et al.*, 2002; LEWIECKI; SILVERMAN, 2006; COMPSTON *et al.*, 2009), tabagismo (LEWIECKI; SILVERMAN, 2006; SEO; KIM; KIM, 2008; COMPSTON *et al.*, 2009), inatividade física (LINDSEY *et al.*, 2005; OCARINO; SERAKIDES, 2006; JAVAID; HOLT, 2008; SEO; KIM; KIM, 2008; COMPSTON *et al.*, 2009), anticoagulantes e glicocorticóides (PINTO NETO *et al.*, 2002; JAVAID; HOLT, 2008; COMPSTON *et al.*, 2009). Esses diversos fatores modificam o metabolismo ósseo e geram uma diminuição da formação óssea e/ou aumentam a reabsorção (MORRI; GENANT, 1998; BORBA; LAZARETTI-CASTRO, 1999; PINTO NETO *et al.*, 2002; GIROTRA; RUBIN; BILEZIKIAN, 2006).

Os fatores de risco, também, podem estar relacionados com características individuais ou populacionais, como idade, sexo, índice de massa corporal, prematuridade da menopausa, história familiar e raça. A idade é um dos principais fatores para a osteoporose, pois quanto maior a idade, há uma maior probabilidade de se apresentar maior fragilidade óssea e ocorrência de fraturas. A osteoporose pode afetar ambos os sexos, mas as mulheres após a menopausa apresentam maiores riscos, devido a uma perda óssea acelerada causada pela diminuição hormonal. Outro fator importante é a raça, pois caucasianos e asiáticos apresentam maiores índices de osteoporose (JAVOID; HOLT, 2008).

A diminuição da densidade do tecido ósseo e a deteriorização da microarquitetura óssea são as principais causas de fraturas devido à fragilidade óssea. As regiões mais acometidas são as vértebras, a região distal do antebraço, úmero, costelas, clavícula e o quadril (JOHNELL; KANIS, 2005; KORSIC; GRAZIO, 2008).

Com a análise desses diversos fatores de riscos apresentados, pode-se determinar uma parcela da população com elevados riscos ao diagnóstico de osteoporose, composta por: mulheres com menopausa precoce, casos recorrentes de fratura, utilização de corticoesteróides e presença de história familiar significativa de fragilidade óssea (MORRI; GENANT, 1998; PINTO NETO *et al.*, 2002; SORNAY-RENDU *et al.*, 2005; ROBITAILLE *et al.*, 2008; COMPSTON *et al.*, 2009).

A osteoporose pode ser considerada um problema mundial para a saúde pública, por apresentar: um extenso número de pessoas acometidas, uma progressiva deteriorização da saúde e altas taxas de mortalidades que associados geram elevados custos econômicos (MORRI; GENANT, 1998; PINTO NETO *et al.*, 2002). A elevação da expectativa de vida tende a aumentar o índice de osteoporose da população, e conseqüentemente, prejudica as condições da saúde pública (PASCO *et al.*, 2006).

O estudo de Cheng *et al.* (2009), com intuito de prover dados epidemiológicos mais fidedignos do índice de osteoporose apresentado por idosos nos Estados Unidos, analisou uma grande amostra nacional de beneficiários do programa governamental de assistência a saúde para idosos. O programa contava com 911 327 beneficiários com seis a sete anos de cobertura do plano, e foi encontrada uma prevalência de 29,7% de pacientes com osteoporose e fraturas associadas. A prevalência foi quatro vezes maior para mulheres do que homens, e duas vezes para brancos, americanos hispânicos e asiáticos.

Recentes dados epidemiológicos do Reino Unido sugerem que 1,2 milhões de mulheres apresentam osteoporose e ocorrem aproximadamente 60.000 fraturas de quadril,

50.000 fraturas da região distal do radio e 40.000 fraturas vertebrais anualmente (DENNISON *et al.*, 2006).

Um estudo, realizado em dez países europeus, avaliou a incidência das lesões mais comuns, da faixa etária mais acometida, e dos custos econômicos gerados pelos cuidados a essa população. E foi encontrado que a faixa etária mais acometida é igual ou superior a 65 anos, principalmente mulheres, com gastos vultosos causados principalmente por fraturas de quadril, de joelhos e membros inferiores (POLINDER *et al.*, 2005).

Em um estudo populacional, realizado em cinco cidades de diferentes países da América Latina (Argentina, Brasil, Colômbia, México e Porto Rico), foi encontrada uma prevalência de 11,18% de pacientes com fraturas vertebrais em uma amostra de 1.922 mulheres com mais de 50 anos. Os dados apresentaram similaridades em todos os países analisados, e observou-se um aumento do índice conforme a idade, com 6,9% em mulheres de 50 a 59 anos e 27,8% em mulheres com mais de 80 anos. A prevalência encontrada na América Latina é levemente menor do que a encontrada nas mulheres brancas dos Estados Unidos e similar a região de Beijing da China (CLARK *et al.*, 2009).

O estudo de Pasco *et al.* (2006) sugere que a maior quantidade de fraturas ocorre em mulheres com densidade mineral óssea normal ou com osteopenia, apesar do maior risco apresentado pelas mulheres que apresentam um processo osteoporótico. Este fato ocorre devido a que somente uma pequena parcela da população, menos de 20%, apresenta osteoporose, e que contribui com somente um quarto da ocorrência de todas as fraturas registradas. Quase o dobro do número de fraturas é apresentado por mulheres osteopênicas e este número representa 50% do risco total da população a fraturas.

O estudo de Suhm, Lamy e Lippuner (2008) avaliou a incidência de fraturas predispostas por fragilidade óssea em pacientes com mais de 50 anos em oito centros médicos da Suíça. Os oito centros recrutaram 4966 pacientes que apresentavam uma ou mais fraturas nos períodos de 2004 a 2006. Destes 3667 pacientes, (2797 mulheres com 73,8 anos e 870 homens com 73 anos) aproximadamente 74%, apresentavam fraturas causadas por fragilidade óssea. As fraturas foram divididas por regiões afetadas: membros superiores (30,7%), membros inferiores (26,4%), esqueleto axial (19,5%) e outras localizações (23,4%). Os pacientes hospitalizados representavam 80% do número total estudado, com uma média de internação de nove dias. As fraturas resultaram em uma perda momentânea ou permanente de independência, com aproximadamente um terço dos pacientes sendo encaminhados para uma reabilitação clínica e um sexto sendo institucionalizado. Os autores concluíram que a

osteoporose continua largamente não diagnosticada e não tratada, fato que promove um alto risco a população idosa a fraturas por fragilidade.

As fraturas osteoporóticas são associadas a índices significantes de morbidade e as fraturas osteoporóticas vertebrais e de quadril, também, são associadas a altos índices de mortalidade (DENNISON; COLE; COOPER, 2005).

O estudo de Bliuc *et al.* (2009), realizado em Dubbo na Austrália, analisou o índice de mortalidade de pacientes com mais de 60 anos que apresentaram uma fratura osteoporótica entre os anos de 1989 a 2007. Neste estudo, encontraram-se 952 mulheres e 343 homens com pelo menos uma fratura osteoporótica, a partir de uma população de 2245 mulheres e 1760 homens com mais de 60 anos, e desse total foram analisados 452 mulheres e 162 homens. Os dados demonstraram um aumento da mortalidade associado a vários tipos de fraturas e ao aumento da idade dos pacientes que apresentavam osteoporose. As fraturas que não ocorreram nas regiões vertebrais e de quadril constituíram 50% do número total de fraturas e foram associadas com mais de 40% de ocorrência de todas as mortes deste estudo. Já em relação às fraturas de quadril, encontrou-se que 30% delas, levaram a morte nos primeiros seis meses.

Após um ano da ocorrência de uma fratura de quadril, 40% das pessoas que sobrevivem são incapazes de andar independentemente e 80% não conseguem realizar uma única atividade de vida diária independentemente (COOPER, 1997). Os efeitos adversos das fraturas vertebrais são freqüentemente subestimados, mas resultam em perda de peso, dor, diminuição da capacidade pulmonar, aumento do risco de quedas, desordens de sono, aumento da dependência funcional e diminuição de apetite (SILVERMAN, 1992).

Após a fratura, o paciente é incapaz de retornar a sua plena funcionalidade até a completa consolidação óssea. Esse processo pode se prolongar por muitos meses. Caso não ocorra uma reparação óssea adequada, o processo poderá evoluir para um atraso da união-óssea ou até uma não união óssea que promove uma grande fragilidade óssea e incapacita o paciente de retornar as suas atividades diárias (PICKERING; SCAMMELL, 2002).

Dentro deste contexto, avanços biofísicos e bioquímicos têm sido investigados na tentativa de minimizar o tempo de reparo ósseo (HADJIARGYROU *et al.*, 1998; PICKERING; SCAMMELL, 2002; RUTTEN *et al.*, 2007) e complicações advindas do processo anormal de reparação óssea ocorrida com a osteoporose e osteopenia (LILL *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Pode-se citar a aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas (YAOITA *et al.*, 2000), o ultra-som de baixa intensidade (HADJIARGYROU *et al.*, 1998; RUTTEN *et al.*, 2007) e o uso de campos magnéticos (PICKERING; SCAMMELL, 2002). E

mais recentemente vem se destacando as propriedades osteogênicas dos biomateriais (MOURA *et al.*, 2007; CAMILO *et al.*, 2009) e do laser terapêutico de baixa intensidade, conhecido como Terapia Laser de Baixa Intensidade, *Low Level Laser Therapy* (LLLT) (NICOLAU *et al.*, 2003; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; SILVA, 2006).

O biomaterial é definido, como: um material capaz de produzir uma resposta biológica específica e uma interface entre o material e o tecido, formando uma ligação entre esses, sem ser tóxico ou promover respostas imunológicas (HENCH; POLAK, 2002; MOURA *et al.*, 2007). Entre esses podem ser citados: as suturas biodegradáveis, as válvulas cardíacas, as próteses esqueléticas e os materiais bioativos (HENCH; POLAK, 2002).

Atualmente, um dos materiais bioativos mais estudados é o vidro bioativo, composto por  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$ , que em contato com tecidos vivos reage e transforma-se em Hidroxicarbonoapatita (HCA), equivalente a fase mineral inorgânica do osso. Este, também, induz a um aumento da proliferação e diferenciação das células responsáveis pela formação óssea. Devido a essas propriedades, os vidros bioativos são utilizados há cerca de 30 anos na forma de implantes em cirurgias cranio-maxilo-faciais e ortopédicas (HENCH; POLAK, 2002).

O vidro bioativo *Bioglass*<sup>®</sup> 45S5 é conhecido por apresentar um dos maiores índices de bioatividade no tecido ósseo, mas apresenta baixas propriedades mecânicas (DUCHEYNE; QIU, 1999; DIEUDONNE *et al.*, 2002) que promovem uma região de fragilidade a constituição óssea quando são utilizados na forma de implantes. As vitrocerâmicas foram desenvolvidas, a partir da cristalinização controlada de certos vidros bioativos, para melhorar as propriedades mecânicas encontradas nos vidros (JAMES, 1995), entretanto nesse processo ocorreu uma grande diminuição do índice de bioatividade (HENCH; WEST, 1996), o qual é definido como o inverso do tempo requerido para que 50% da superfície do material esteja intimamente ligado ao osso (HENCH; WILSON, 1993). Com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas sem diminuir o índice de bioatividade foi desenvolvido o Biosilicato<sup>®</sup> (MOURA *et al.*, 2007).

Moura *et al.* (2007) observaram que o Biosilicato<sup>®</sup> teve um efeito superior ao *Bioglass*<sup>®</sup> 45S5 ao apresentar uma maior processo de calcificação da matriz, em cultura de célula.

A LLLT pode ser usada com a finalidade de modular o tecido vivo por meio de um processo de fotoestimulação ou fotoinibição, que se refere à aplicação de uma energia eletromagnética ao tecido biológico, como forma de tratamento, para que o tecido vivo apresente alterações das funções bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. A estimulação ou a

inibição do tecido vivo podem estar relacionadas com a quantidade de energia aplicada ao tecido por meio dos parâmetros utilizados pela irradiação (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004; AMAT *et al.*, 2006).

Há diversos estudos que relatam a eficácia dessa terapia em relação ao processo de reparo ósseo (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HÖFLING, 2000; NICOLAU *et al.*, 2003), aos aspectos histológicos (KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; PINHEIRO *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2003), enzimáticos (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995) e mecânicos (LUGER *et al.*, 1998; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; SILVA, 2006). Também há estudos *in vitro* com células ósseas para tentar elucidar os mecanismos de fotoestimulação do tecido ósseo (OZAWA; SHIMIZU; ABIKO, 1998; GUZZARDELLA *et al.*, 2002; STEIN *et al.*, 2005).

Contudo, há ainda divergência da literatura em relação aos parâmetros da LLLT para tratar reparos ósseos, principalmente em relação à fluência. Também há poucos dados sobre a interação de um biomaterial, vitrocerâmico, com a LLLT em um processo de reparo ósseo de um tecido osteopênico. Essa interação pode ser benéfica se ocorrer à adição das propriedades mecânicas e do índice de bioatividade dos materiais bioativos com as propriedades fotoestimuladoras da terapia laser.

Como modelo de estudo experimental, ratas ovariectomizadas têm sido extremamente utilizadas, pois fornecem dados fundamentais semelhantes ao observado no esqueleto adulto pós-menopausico. Embora, não exista um animal que atenda os requisitos de modelo ideal, a rata tem sido amplamente utilizada e aprovada, pois, como a mulher após a menopausa desenvolve a osteopenia, as ratas após a ovariectomia também desenvolvem essa deficiência (MELLO; GOMIDE, 2005). Como já relatado, as fraturas são as conseqüências mais importantes da fragilidade óssea causada pela osteoporose e osteopenia. As fraturas de quadril e vertebrais são muito importantes, mas, fraturas em outros locais, também, são reconhecidas como relevantes e geram grandes adversidades e complicações aos pacientes, pode-se citar como exemplo, a fratura de tíbia (KORSIC; GRAZIO, 2008). Após a realização de uma osteotomia em ratas ovariectomizada, foi encontrado que após 14 dias da operação cirúrgica, houve alteração do processo de reparo ósseo com uma diminuição da resposta tecidual a lesão (CHICARELLI, *et al.*, 2007). Neste estudo, realizou-se uma osteotomia sobre tíbias osteopênicas de ratas ovariectomizadas e também foram realizados testes biomecânicos, após 14 dias de reparo ósseo.

## **1.2- OBJETIVO**

Este estudo teve como objetivo verificar os efeitos do laser de baixa intensidade ( $\lambda = 830\text{nm}$ ), com fluências de  $60\text{J/cm}^2$  e  $120\text{J/cm}^2$  e de um biomaterial, Biosilicato<sup>®</sup>, utilizados independentemente ou associados sobre as propriedades biomecânicas de tíbias osteotomizadas em ratas osteopênicas.

## **1.3- MÉTODO**

### **1.3.1- Animais de Experimentação**

Este estudo foi conduzido de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e aprovado pelo comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos (n° 025/2006) (Anexo 1).

Para o estudo, foram utilizadas 70 ratas *Wistar*, com doze semanas de idade e peso corporal médio de 250 gramas. Os animais eram procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), e foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisioterapia da mesma instituição, durante todo o procedimento experimental. Permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, ambiente higienizado, temperatura e ventilação adequadas), recebendo ração própria comum e água a vontade.

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Eletrotermofototerapia da UFSCar, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nivaldo Antônio Parizotto.

### **1.3.2- Delineamento Experimental**

As 70 ratas utilizadas nesta pesquisa foram pesadas e distribuídas, aleatoriamente, em 7 grupos de 10 animais, para a realização da ovariectomia. Após a operação, essas ratas permaneceram no Biotério por 60 dias com o intuito de promover uma indução de um processo osteopênico (KALU, 1991; TEÓFILO *et al.*, 2003). Após esse período, foram feitos defeitos ósseos, osteotomias com 2mm de diâmetro na tíbia, em todos os grupos, com exceção do grupo controle padrão.

**Grupo 1 (CP) – Controle Padrão:** as ratas deste grupo não foram submetidas à osteotomia e a nenhum tratamento.

**Grupo 2 (CD) – Controle com defeito ósseo:** os animais deste grupo foram submetidos à simulação da radiação laser em um único ponto por um tempo de 34 segundos. A simulação da aplicação do laser ocorreu imediatamente após a osteotomia e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias após a operação.

**Grupo 3 (B) – Grupo com Biosilicato<sup>®</sup>:** os animais deste grupo receberam a aplicação de Biosilicato<sup>®</sup>, logo após a realização da osteotomia. Foram submetidos à simulação da radiação laser em um único ponto por um tempo de 34 segundos. A simulação da aplicação do laser ocorreu imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias após a cirurgia.

**Grupo 4 (L60) – Grupo com laser (60J/cm<sup>2</sup>):** os animais deste grupo foram submetidos à radiação laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ), com fluência de 60J/cm<sup>2</sup>, por 17 segundos, fornecendo 1,7J de energia, imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias após a operação.

**Grupo 5 (L120) – Grupo com laser (120J/cm<sup>2</sup>):** os animais deste grupo foram submetidos à radiação laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ), com fluência de 120J/cm<sup>2</sup>, por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia, imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias após a operação.

**Grupo 6 (B+L60) – Grupo com laser (60J/cm<sup>2</sup>) e Biosilicato<sup>®</sup>:** os animais deste grupo receberam a aplicação de Biosilicato<sup>®</sup>, logo após a realização da osteotomia. Foram submetidos à radiação laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ), com fluência de 60J/cm<sup>2</sup>, por 17 segundos,

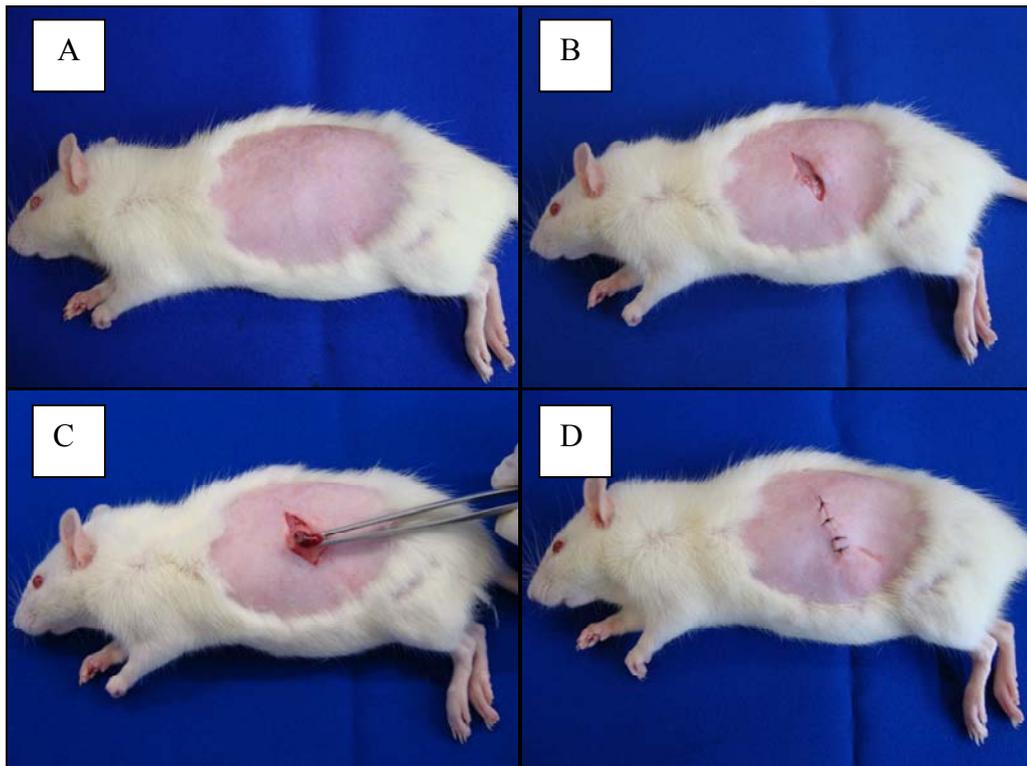
fornecendo 1,7J de energia, imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias após a operação.

**Grupo 7 (B+L120) – Grupo com laser (120J/cm<sup>2</sup>) e Biosilicato<sup>®</sup>:** os animais deste grupo receberam a aplicação de Biosilicato<sup>®</sup>, logo após a realização da osteotomia. Foram submetidos à radiação laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ), com fluência de 120 J/cm<sup>2</sup>, por 34 segundos, fornecendo 3,4J de energia, imediatamente após o procedimento operatório e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias após a operação.

### 1.3.3- Técnica Operatória

#### 1.3.3.1- Ovariectomia

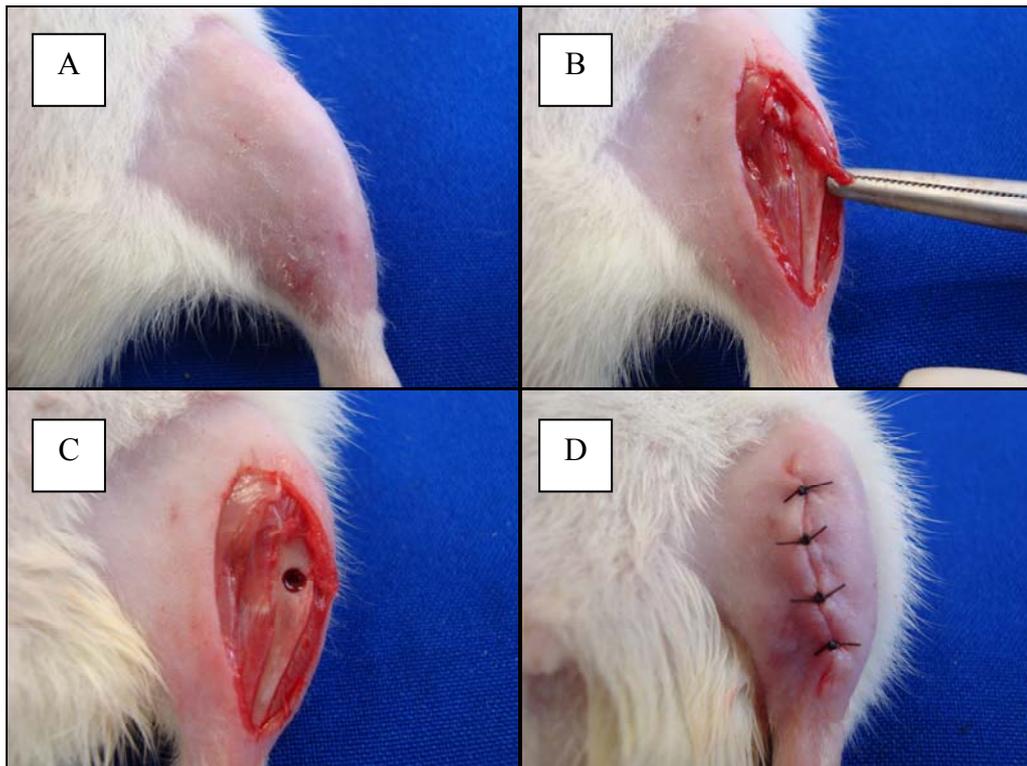
As ratas foram pesadas e, em seguida, anestesiadas proporcionalmente à massa corporal, com uma associação Ketamina/ Xilazina (80/10mg/Kg), injetada por via intraperitoneal, utilizando-se uma seringa de insulina. Após a indução anestésica, realizou-se a depilação digital da região abdominal. As ratas sofreram incisões translobares para a retirada de ambos os ovários, de acordo com o método proposto por Kalu (1991). Ao final do procedimento, foram realizadas suturas internas com fio reabsorvível (Shalon<sup>®</sup> SUTURAS, CATGUT CROMADO) e suturas externas com fio de náilon monofilamentar 4-0 (não-reabsorvível) (Shalon<sup>®</sup> SUTURAS, NYLON 4-0) (Figura 1). Após a cirurgia, as ratas foram acondicionadas no biotério do Departamento de Fisioterapia (UFSCar) e permaneceram um período de 60 dias, visando a indução do quadro de osteopenia (KALU, 1991; TEÓFILO *et al.*, 2003).



**Figura 1** - Procedimento de Ovariectomia: A- Tricotomia digital, B- Incisão cutânea, C- Incisão abdominal para a retirada de ambos os ovários, D- Sutura da região operada.

### 1.3.3.2- Osteotomia

No 61º dia após a ovariectomia, foi realizado a osteotomia por meio de uma Mini Furadeira Drimmer, da marca TODA LUZ<sup>®</sup> acionada por um minidrill com rotação de 12.000rpm, com uma broca helicoidal paralela (Loyal<sup>®</sup>) de 2mm de diâmetro, irrigada com soro fisiológico para evitar o processo de queima do tecido ósseo. Após anestesia, depilação e assepsia da área a ser operada, foram realizadas as osteotomias nas tíbias, por meio de uma incisão no terço proximal. A osteotomia foi padronizada, com um paquímetro, a 10mm de distância da articulação do joelho. A lesão foi realizada com a broca mantida na posição vertical e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular abaixo desta, porém sem atingir a face contralateral. A pele e a musculatura foram suturadas com fio de náilon monofilamentar 4-0 e com distância de 1 cm entre os pontos (Figura 2). Os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso a água e comida até o momento do sacrifício.



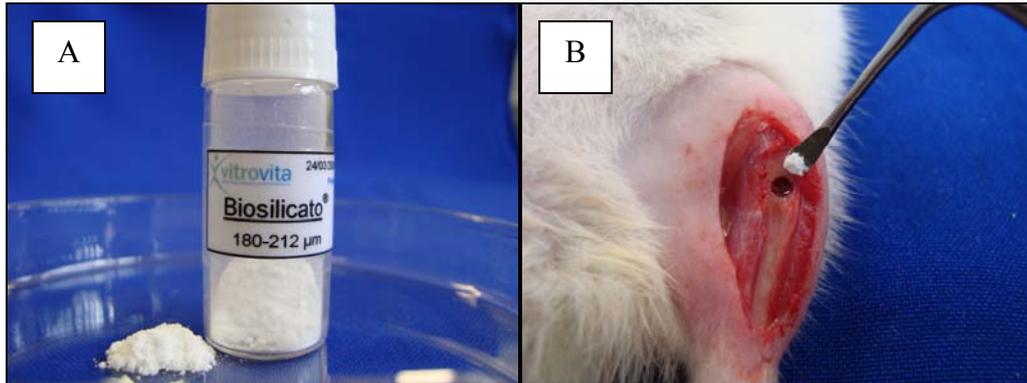
**Figura 2** - Procedimento de Osteotomia: A- Tricotomia digital, B- Incisão na região tibial, C- Osteotomia, D- Sutura da região operada.

### 1.3.4- Tratamento

#### 1.3.4.1- Biomaterial

O material bioativo, Biosilicato<sup>®</sup> (patente WO 2004/074199, ZANOTTO *et al.*, 2004) foi desenvolvido pelos pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com objetivo de produzir uma vitrocerâmica que conservasse o elevado nível de bioatividade que é apresentado pelos vidros bioativos, e que, ao mesmo tempo, apresentasse melhores propriedades mecânicas. Com este intuito, desenvolveram um material composto por um sistema quaternário de  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ , completamente cristalizado por um tratamento térmico específico.

O biomaterial, Biosilicato<sup>®</sup>, com granulometria de 180-212 $\mu$ m, foi aplicado com uma espátula até o preenchimento completo do defeito ósseo, logo após a osteotomia (Figura 3).



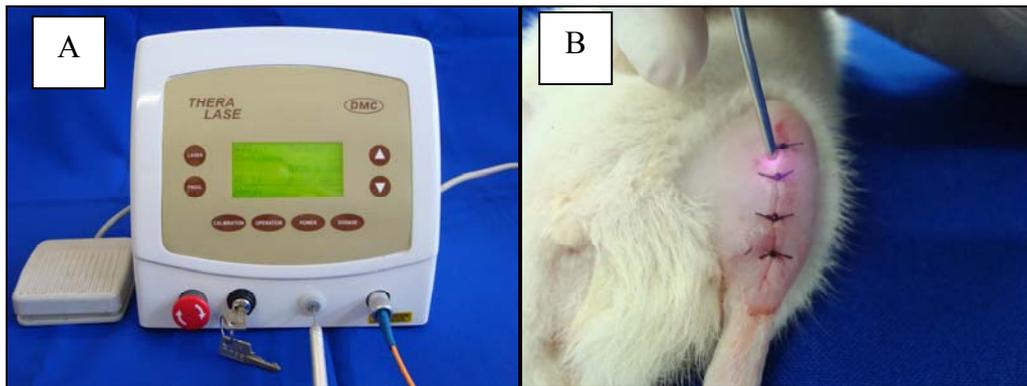
**Figura 3** - Tratamento com o Biosilicato<sup>®</sup>: A- Biosilicato<sup>®</sup>, B- Aplicação do Biosilicato<sup>®</sup>.

#### 1.3.4.2- Laser

O aparelho utilizado foi um modelo portátil de Laser DMC, THERALASE<sup>®</sup> Versão 24, classe 3B, Ga-Al-As diodo, com comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída de 100mW, densidade de potência de  $3,57\text{W}/\text{cm}^2$ , área do feixe de  $0,028\text{cm}^2$  (Figura 4).

Inicialmente o equipamento foi calibrado e após o procedimento experimental novamente aferido no Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), a fim de se obter uma alta confiabilidade na intensidade efetiva da emissão laser.

O laser foi aplicado imediatamente após a osteotomia e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo e décimo segundo dias de pós-operatório, totalizando sete aplicações em catorze dias. Foi utilizado somente um único ponto de aplicação sobre a osteotomia, o qual foi palpado e medido com um paquímetro. Nas aplicações, foi utilizada a técnica pontual em contato, cujo posicionamento da fibra do equipamento é perpendicular ao tecido e as irradiações foram realizadas sempre no mesmo horário (Figura 4).



**Figura 4** - Tratamento Laser: A- Equipamento Laser, B- Irradiação.

### 1.3.5- Sacrifício dos Animais

No décimo quarto dia, após a osteotomia, os animais foram anestesiados, e sacrificados com uma dose letal de cloreto de potássio (KCl), injetado por via intracardiaca.

### 1.3.6- Coleta da Amostra

Após a eutanásia, foi realizada a ressecção cirúrgica das tíbias. A tíbia esquerda foi utilizada em uma análise biomecânica e foi acondicionada em soro fisiológico no freezer (- 24°C) até o momento do teste.

### 1.3.7- Análise Biomecânica

O teste biomecânico foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) sob responsabilidade da Profa. Dra. Keico Okino Nonaka. As propriedades biomecânicas do osso foram determinadas em uma Máquina de Ensaio Universal Instron (Corporação Instron, MA, modelo 4444) em temperatura ambiente (Figura 5). Foram realizados dois testes, o Teste de Endentação (SHEN *et al.*, 1995; KAMALI *et al.*, 2007; LIND *et al.*, 2008) e o Teste de Flexão a Três Pontos (ENGESAETER;

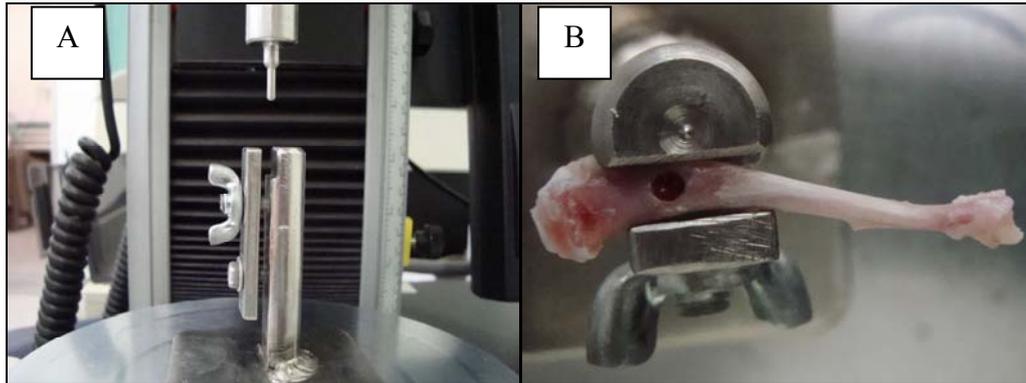
EKELAND; LANGELAND, 1978; PENG *et al.*, 1994). O primeiro avaliou as propriedades biomecânicas do calo ósseo e a aderência de sua interface ao osso. O segundo foi realizado após o término do primeiro teste e analisou as propriedades biomecânicas do osso de forma geral, sem considerar a resistência e a aderência do calo ósseo que foram medidas no primeiro teste.



**Figura 5** - Foto da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444).

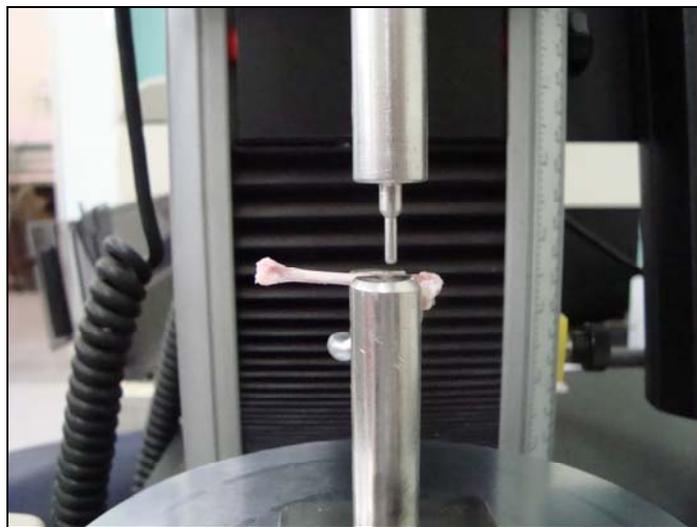
### **1.3.7.1- Teste de Endentação**

Para a realização do Teste de Endentação, foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1 KN e pré-carga de 1N. O osso foi fixo por meio de um suporte que sustentava as regiões posteriores e laterais do osso de forma que a osteotomia se posicionasse com a sua face voltada para cima com estabilidade e sem movimentos adicionais (Figura 6).



**Figura 6-** Teste de Endentação: A- Suporte do teste, B – Tíbia fixa pelo suporte.

Um endentador cilíndrico de 2,0mm de diâmetro foi aplicado ao centro do calo ósseo em uma velocidade constante de 1mm/min. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido ântero-posterior registrando somente a resistência do calo ósseo, com profundidade de penetração de 1,5mm a partir da pré-carga (Figura 7). A força aplicada e o deslocamento do endentador foram monitorados e registrados por meio de um programa próprio do equipamento (INSTRON Series IX).

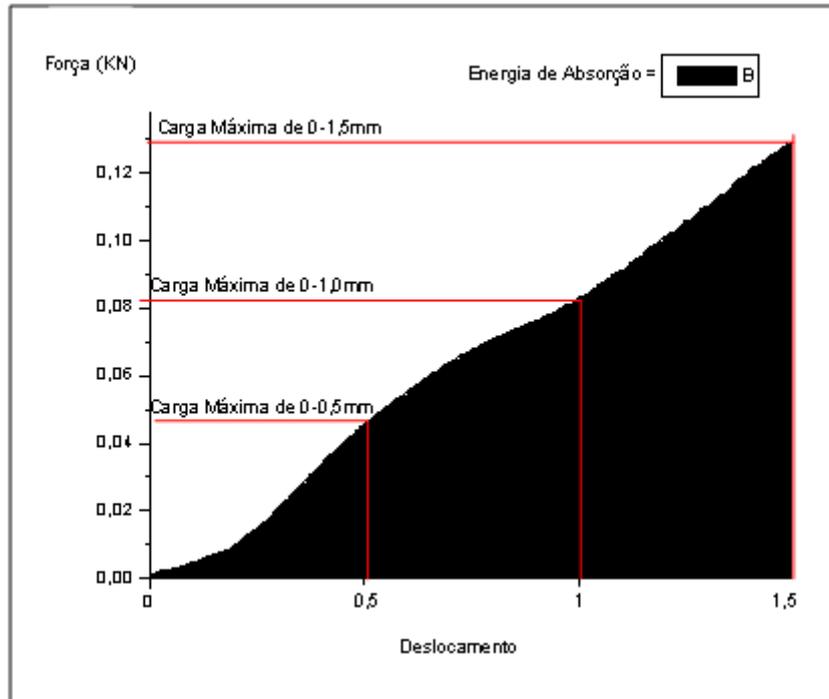


**Figura 7 –** Teste de Endentação.

Desse modo, calcularam-se as curvas de força-penetração para os diversos ensaios. Com esses dados foram calculados a carga máxima (KN) e a energia de absorção ou resistência (J).

A carga máxima é definida como a força máxima registrada durante o deslocamento padronizado do endentador. A energia de absorção é definida como a medida da quantidade de energia necessária para perfurar o calo ósseo, e corresponde à área sob a

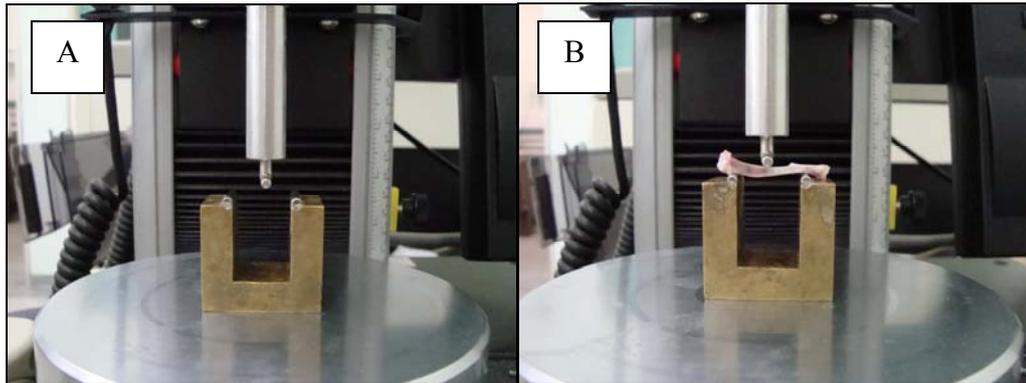
curva força-penetração até o ponto de deslocamento padronizado, cálculos modificados de Engesaeter, Ekeland e Langeland (1978) e Peng *et al.* (1994) (Figura 8).



**Figura 8** – Gráfico do Teste de Endentação: Curva Força-Penetração.

### 1.3.7.2- Teste de Flexão a Três Pontos

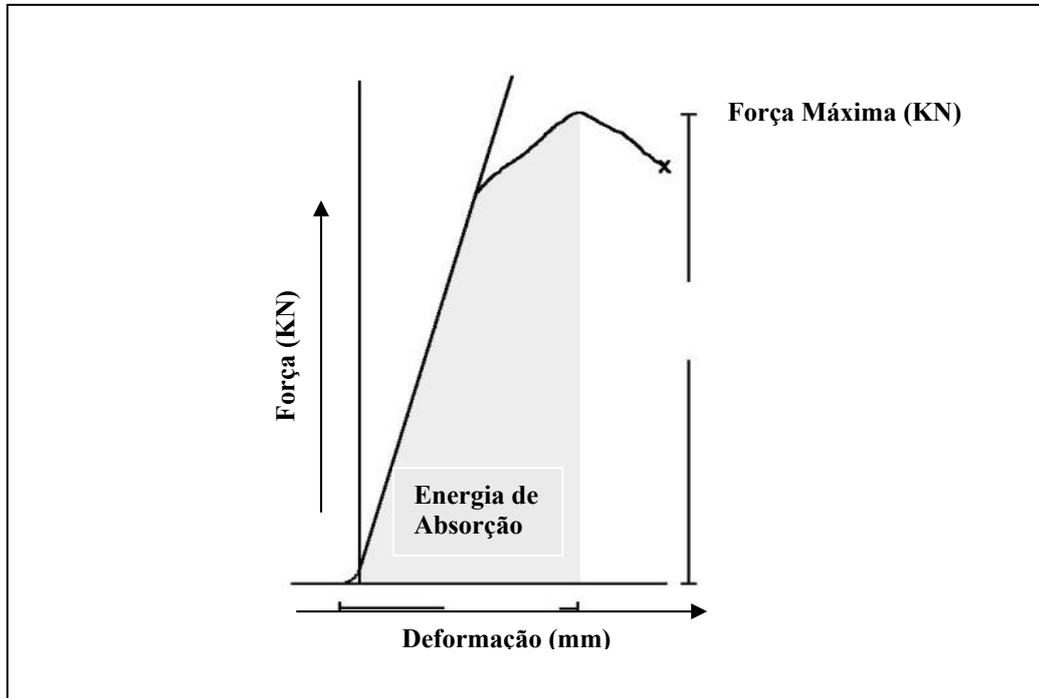
O teste de Flexão a Três Pontos foi realizado na tíbia esquerda após a realização do Teste de Endentação. Para a realização do Teste de Flexão a Três Pontos, foi utilizado uma pré-carga de 5N e uma velocidade constante de 5mm/min. As extremidades da tíbia ficaram apoiadas em dois suportes com distâncias de 21,7mm entre eles e a osteotomia foi posicionada na face contralateral a compressão promovida ao osso e entre os dois apoios. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterio-anterior, por uma haste cilíndrica até a fratura completa do osso (Figura 9). A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados por meio de um programa próprio do equipamento (INSTRON Series IX).



**Figura 9** – Teste de Flexão a Três Pontos: A - Suporte, B – Osso fixo pela pré-carga.

Desse modo, obtiveram-se as curvas de força-deformação para os diversos ensaios e foram calculadas a carga máxima (KN) e a energia de absorção ou resistência (J).

A carga máxima é definida como a força máxima que o osso pode suportar. A energia de absorção é a medida da quantidade de energia necessária para causar fratura, e corresponde à área sob a curva força-deformação até o ponto de carga máxima (Figura 10) (ENGESAETER, EKELAND, LANGELAND, 1978; PENG *et al.*, 1994).



**Figura 10** – Gráfico do Teste de Flexão a Três Pontos.

### 1.3.7.3- Parâmetros Avaliados

Em relação ao Teste de Flexão a Três Pontos, a carga máxima é definida como a força máxima que o osso pode suportar. A energia de absorção é a medida da quantidade de energia necessária para causar a fratura do osso (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; PENG *et al.*, 1994). Em relação ao Teste de Endentação, não há quebra do osso, mas ocorre a perfuração do calo ósseo. Neste caso, a energia de absorção é definida por meio do parâmetro de penetração da curva força-penetração. A energia de absorção é a área da curva força-penetração e corresponde a um parâmetro médio de resistência do calo ósseo, e a carga máxima refere-se a um valor pico de resistência, cálculos modificados de Engesaeter, Ekeland e Langeland (1978) e Peng *et al.* (1994).

### 1.3.8- Formas de Análise dos Resultados

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas dos parâmetros quantitativos estudados; média (M) e erro padrão da média (EPM). Na comparação entre os grupos foi utilizada Teste de Kruskal-Wallis e, nos casos significantes, o Teste de Mann-Whitney U para discriminar as diferenças. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Para todas as análises foram utilizados o programa EXCEL 2003 e o STATISTICA 7.

## 1.4- REFERÊNCIAS

AMAT, A.; RIGAU, J.; WAYNANT, R. W.; ILEV, I. K.; ANDERS, J. J. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. **J Photochem Photobiol B**, v. 82, p. 152-160, 2006.

AMADEI, S. U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n.1, p. 5-12, 2006.

BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of Low-Energy Laser (He-Ne) Irradiation on the Process of Bone Repair in Rat Tibia. **Bone**, v. 16, n.1, p. 47-55, 1995.

BLIUC D.; NGUYEN D. N.; MILCH V. E.; NGUYEN T. V; EISMAN J. A.; CENTER J. R. Mortality Risk Associated With Low-Trauma Osteoporotic Fracture and Subsequent Fracture in Men and Women. **JAMA**, v. 301, n. 5, p. 513-521, 2009.

BORBA, V. Z. C; LAZARETTI-CASTRO, M. Osteoporose Induzida por Glicocorticóide. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 43, n. 6, p. 452-456, 1999.

CAMILO C. C.; FORTULAN C. A.; PARIZOTTO N. A.; PURQUERIO B. M. Porous Alumina Scaffolds with Bioactive Coating: Implants in the Rat Tibia and In vitro Studies. **Key Eng Mater**, v. 396-398, p 699-702, 2009.

CLARK P.; CONS-MOLINA, F.; DELEZE, M.; RAGI, S.; HADDOCK, L.; ZANCHETTA, J. R.; JALLER, J. J.; PALERMO, L.; TALAVERA, J. O.; MESSINA, D. O.; MORALES-TORRES, J.; SALMERON, J.; NAVARRETE, A.; SUAREZ, E.; PÉREZ, C. M.; CUMMINGS, S. R. The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: the Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). **Osteoporos Int**, v. 20, p. 275–282, 2009.

CHENG H.; GARY L. C.; CURTIS J. R.; SAAG K. G.; KILGORE M. L.; MORRISEY M. A.; MATTHEWS R.; SMITH W. ; YUN H; DELZELL. E. Estimated prevalence and patterns of presumed osteoporosis among older Americans based on Medicare data. **Osteoporos Int**, 2009. DOI 10.1007/s00198-009-0835-z. Disponível em <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19189165>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2009.

COMPSTON J.; COOPER A.; COOPER C.; FRANCIS R.; KANIS J.A.; MARSH D.; McCLOSKEY E.V.; REID D.M.; SELBY P.; WILKINS M.; ON BEHALF OF THE NATIONAL OSTEOPOROSIS GUIDELINE GROUP (NOGG). Guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and men from the age of 50 years in the UK. . **Maturitas**, 2009, doi:10.1016/j.maturitas.2008.11.022. Disponível em <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135323>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2009.

COOPER, C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. **Am J Med**, v. 103, n. 2A, p. 12S-9, 1997.

DENNISON, E.; MOHAMED, M.A.; COOPER, C. Epidemiology of osteoporosis. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 32, p. 617–629, 2006.

DENNISON, E.; COLE, Z.; COOPER, C. Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 17, p. 356-361, 2005.

DIEUDONNE, S. C.; van den DOLDER, J.; de RUIJTER, J. E.; PALDAN, H.; PELTOLA, T.; van't HOF MA; HAPPONEN, R. P.; JANSEN, J. A. Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. **Biomaterials**, v. 23, p. 3041-3051, 2002.

DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, v. 20, p. 2287-2303, 1999.

ENGESAETER, L. B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthop Scand**, v. 49, p. 512-518, 1978.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Laser effects on osteogenesis. **Appl Surf Sci**, v. 154-155, p. 548-554, 2000.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO P. P.; PADOVANI, C. R.; DAL PAI-SILVA, M.; CRUZ-HÖFLING M. A. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J Photochem Photobiol B**, v. 70, p. 81-89, 2003.

GIROTRA, M.; RUBIN, M. R.; BILEZIKIAN, J. P. Anabolic Skeletal Therapy for Osteoporosis. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 4, p. 745-754, 2006.

GUZZARDELLA, G. A.; FINI, M.; TORICELLI, P.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Laser Stimulation on Bone Defect Healing: In Vitro Study. **Lasers Med Sci**, v. 17, p. 216-220, 2002.

HADJIARGYROU, M.; McLEOD, K.; RYABY, J. P.; RUBIN, C. Enhancement of Fracture Healing by Low Intensity Ultrasound. **Clin Orthop Relat Res**, n. 355S, p. 216-229, 1998.

HENCH LL, WEST JK. Biological applications of bioactive glasses. **Life Chem Rep**, v. 13, p. 187-241, 1996.

HENCH, L. L, WILSON, J. An introduction to bioceramics. Singapore: **World Scientific**, 1993, 386pp.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, p. 1016-1017, 2002.

JAMES, P. F. Glass ceramics: New compositions and uses. **J Non-Cryst Solids**, v. 181, p. 1-15, 1995.

JAVAID, M. K.; HOLT, R. I. Understanding osteoporosis. **J Psychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 38-45, 2008.

JOHNEEL, O.; KANIS, J. Epidemiology of osteoporotic fractures. **Osteoporos Int**, v. 16, p. S3-S7, 2005.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v. 15, p. 171-192, 1991.

KAMALI, F.; BAYAT, M.; TORKAMAN, G.; EBRAHIMI, E.; SALAVATI, M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. **J Photochem Photobiol B**, v. 88, p. 11-15, 2007.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of Low-Energy Laser Irradiation on Bone Remodeling During Experimental Tooth Movement in Rats. **Lasers Surg Med**, v. 26, p. 282-291, 2000.

KORSIC, M.; GRAZIO, S. Non-hip perioheral osteoporotic fractures: epidemiology and significance. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 59, p. 53-58, 2008.

LEWIECKI, E. M.; SIVERMAN, S. L. Redefining Osteoporosis Treatment: Who to Treat and How Long to Treat. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 4, p. 694-703, 2006.

LILL, C. A.; HESSELN, J.; SCHLEGEL, U.; ECKHARDT, C.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. **J Orthopaedic Res**, v. 21, n. 5, p. 836-42, 2003.

LIND, M.; LARSEN, A.; CLAUSEN, C.; OSTHER, K.; EVERLAND, H. Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 16, p. 690-698, 2008.

LINDSDEY, C.; BROWNBILL, R. A.; BOHANNON, R. A.; ILICH, J. Z. Association of Physical Performance Measures With Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 86, p. 1102-1107, 2005.

LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; SILVA, O. L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 6, p. 735-40, 2006.

LUGER, E. J.; ROCHKIND, S.; WOLLMAN Y.; KOGAN G.; DEKEL S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, v. 22, p. 97-102, 1998.

MELLO, L. C. P.; GOMIDE, L. B. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. **Rev Nutr**, v. 18, n. 5, p. 593-600, 2005.

MORRI, H.; GENANT, H. K. Statement on the diagnosis and management of osteoporosis from the Consensus Development Conference at the Second International Conference on Osteoporosis, Osaka 1997. **J Bone Miner Metab**, v. 16, p. 206-214, 1998.

MOURA, J.; TEXEIRA, L. N., RAVAGNANI, C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; BELOTI, M.M.; PANZERI, H.; ROSA, A.L.; OLIVEIRA, P.T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). **J Biomed Mater Res**, v. 88A, n. 3, p. 545-557, 2007.

NICOLAU, R.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M. T. T.; REIS, L. M. ZÂNGARO, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**, v. 18, p. 89-94, 2003.

OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose, **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, n. 3, p. 164-168, 2006.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. **Bone**, v. 22, p. 347-354, 1998.

PASCO, J. A.; SEEMAN, E.; HENRY, M. J.; MERRIMAN E. N.; NICHOLSON, G. C., KOTOWICZ, M. A. The population burden of fractures originates in women with osteopenia, not osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 17, p. 1404-09, 2006.

PENG, Z.; TUUKKANEN, H.; ZHANG, H.; JÄMSÄ, T.; VÄÄNÄNEN, H. K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-532, 1994.

PICKERING, S. A.W.; SCAMMELL, B. E. Electromagnetic Fields for Bone Healing. **Low Extrem Wounds**, v. 1, n. 3, p. 152-160, 2002.

PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G.; MARTINS, P. P.; RAMALHO, L. M. P.; OLIVEIRA, M. A. M.; NOVAES JUNIOR, A.; NICOLAU, R. A. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Ther**, v. 13, Special Millenium Edition, p. 73-79, 2001.

PINTO NETO A. M.; *et al.* Consenso brasileiro de osteoporose 2002. **Rev Bras Reumatol**, v. 42, n. 6, p. 343-354, 2002.

POLINDER, S.; MEERDING W. J.; BAAR ME; TOET, H.; MULDER, S.; BEECK, E. F. E; O GRUPO DE REFERÊNCIA EUROCAST. Cost Estimation of Injury-Related hospital Admissions in 10 European Cuntries. **J Trauma**, v. 59, n. 6, p. 1283-1291, 2005.

ROBITAILLE, J.; YOON, P. W.; MOORE, C. A.; LIU, T.; IRIZARRY-DELACRUZ, M.; LOOKER, A. C.; KHOURY, M. J. Prevalence, Family History, and Prevention of Reported Osteoporosis in U.S. Women. **Am J Prev Med**, v.35, n.1, p. 47-54, 2008.

RUTTEN, S.; NOLTE, P. A.; GUIT, G. L.; BOUMAN, D. E; ALBERS, G. H. R. Use of Low Pulsed Ultrasound for Posttraumatic Nonunions of the Tibia: A Review of Patients Treated in the Netherlands. **J Trauma**, v. 62, p. 902-908, 2007.

SEO, H. J.; KIM, S. G.; KIM, C. S. Risk factors for bone mineral density at the calcaneus in 40–59 year-old male workers: A cross-sectional study in Korea. **BMC Public Health** 8:253 doi:10.1186/1471-2458-8-253. Visitado em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/8/253>. Acesso em 28 de fevereiro de 2008.

SHEN, V.; BIRCHMAN, R.; XU, R.; OTTER, M.; WU, D.; LINDSAY, R.; DEMPSTER, D. W. Effects of reciprocal treatment with estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. **J Clin Invest**, v. 96, p. 2331- 2338, 1995.

SILVERMAN, S. L. The clinical consequences of vertebral compression fracture. **Bone**, v. 13, n. suppl 2, p. S27-31, 1992.

SORNAY-RENDU, E.; MUNOZ, F.; GARNERO, P.; DUBOEUF, F.; DELMAS, P. D. Identification of osteopenic women at high risks of fracture: the OFELY Study. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 10, p.1813-1819, 2005.

STEIN A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 23, p. 161-166, 2005.

SUHM, N.; LAMY, O.; LIPPUNER K. Management of fragility fractures in Switzerland: results of a nationwide survey. **Swiss Med Wkly**, v. 138, n. 45-46, p. 674-683, 2008.

TEÓFILO, J. M.; AZEVEDO, A. C. B.; PETENUSCI, S. O.; MAZARO, R.; LAMANO-CARVALHO, T. L. Comparison between experimental protocols to promote osteoporosis in the maxila and proximal tibia of female rats. **Pathology**, v. 17, n. 4, p. 302-306, 2003.

VLADIMIROV, Y. A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser radiation. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

YAOITA, H.; ORIMO, H.; HIRAI, Y.; SHIMADA, T. Expression of bone morphogenetic proteins and rat distal-less homolog genes following rat femoral fracture. **J Bone Miner Metab**, v. 18, p. 63-70, 2000.

XU, S. W.; YU, R.; ZHAO, G. F.; WANG, J. W. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. **Chin J Traumatol**, v. 6, n. 3, p. 160-6, 2003.

ZANOTTO E. D., *et al.* **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments.** Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo. Int. C. C03C10/00, 20, WO2004/074199, 2004.

**2- SEGUNDA PARTE**

## 2- SEGUNDA PARTE

### 2.1- CONTEXTUALIZAÇÃO DO ESTUDO 1

O estudo 1 apresentou como objetivo analisar a estimulação do processo de reparo ósseo por meio da utilização de dois tratamentos, o primeiro refere-se a aplicação de um biomaterial, o Biosilicato<sup>®</sup>, e o segundo baseia-se na estimulação do tecido ósseo por meio do tratamento laser. O parâmetro avaliado de melhora da resposta tecidual ao tratamento proposto foi a quantificação da resposta biomecânica do calo ósseo a um teste de resistência a uma força externa. Os valores encontrados representam as propriedades ósseas apresentadas pelo calo ósseo em sua função de sustentação da estrutura óssea a demanda de forças externas, que são freqüentemente encontradas em atividades do cotidiano.

Os dois tratamentos foram avaliados de forma isolada e em associação terapêutica com o intuito de encontrar os melhores parâmetros de utilização desses em um processo de reparo de um osso osteopênico. Essas avaliações foram realizadas em duas profundidades padronizadas do Teste de Endentação, que geram valores diferenciados de resposta tecidual dependentes da profundidade a duas fontes diferentes de tratamento, uma luminosa e outra material.

### 2.2- ESTUDO 1

**Título:** A associação do Biosilicato<sup>®</sup> e da Terapia Laser de Baixa Intensidade aumentou as propriedades biomecânicas, avaliadas em um Teste de Endentação, do calo ósseo de tíbias osteotomizadas em ratas osteopênicas.

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do Biosilicato<sup>®</sup> e da terapia laser no reparo ósseo de ratas osteopênicas. Setenta ratas fêmeas da raça *Wistar* (12-semanas,  $\pm$  250g) foram ovariectomizadas e foram divididas em 7 grupos com 10 animais em cada: controle padrão (CP), controle com defeito ósseo (CD), tratado com Biosilicato<sup>®</sup> (B), tratado

com radiação de 60J/cm<sup>2</sup> (L60), tratado com radiação de 120J/cm<sup>2</sup> (L120), tratado com Biosilicato<sup>®</sup> e radiação de 60J/cm<sup>2</sup> (B+L60), tratado com Biosilicato<sup>®</sup> e radiação de 120J/cm<sup>2</sup> (B+L120). Sessenta dias após a ovariectomia, as tíbias esquerdas foram osteotomizadas. Nos animais tratados com Biosilicato<sup>®</sup>, a cavidade do defeito ósseo gerada pelo osteotomia foi preenchida com o biomaterial. Os animais foram irradiados por sete sessões em dias alternados. No décimo quarto dia após a osteotomia, as ratas foram sacrificadas e as tíbias foram dessecadas. As tíbias foram analisadas por meio de um Teste de Endentação com parâmetros de 0-0,5mm e de 0-1,0mm de penetração e foram avaliadas a carga máxima e a energia de absorção. A análise estatística foi realizada pelo Teste de Kruskal-Wallis e o Teste de Mann-Whitney U, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos CP, B, B+L60 e B+L120 apresentaram maiores valores significantes ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo CD e o grupo B+L120 demonstrou valores significantes mais elevados ( $p \leq 0,05$ ) do que os grupos CD, B, L60, L120 e B+L60. Os resultados do Teste de Endentação demonstraram que a aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo. Os grupos com tratamento baseado somente na terapia laser não apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo controle com defeito ósseo. A melhor resposta biomecânica entre os grupos foi apresentada pelo grupo com utilização do Biosilicato<sup>®</sup> em associação com a terapia laser com fluência de 120J/cm<sup>2</sup>.

**Palavras Chaves:** Osteopenia, Reparo Ósseo, Terapia Laser de Baixa Intensidade, Biomaterial, Teste de Endentação

### 2.2.1- Introdução

A osteoporose é uma síndrome clínica em que a massa óssea é menor do que o esperado para os indivíduos de uma mesma idade e raça, que resulta em fraqueza óssea e aumento da suscetibilidade a fraturas (CULHAN; JIMENES; KING, 1994). A osteoporose representa uma séria ameaça à saúde dos idosos e tem sido reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública (KLEIN *et al.*, 1998). É relacionada com algumas manifestações clínicas, mas uma das principais ocorrências é o aumento do risco de fraturas (SINAKI *et al.*, 1996; KLEIN *et al.*, 1998). As fraturas mais freqüentes ocorrem na região distal do antebraço, vértebras, costelas, úmero, e quadril (DE SMET *et al.*, 1988; SINAKI *et al.*, 1996; BIANCHI *et al.*, 2005).

As fraturas de quadril são consideradas as causas de severas deficiências, que causam a perda de independência do paciente, fato que afeta substancialmente a qualidade de vida (BIANCHI *et al.*, 2005). As fraturas vertebrais resultam em alterações nas curvaturas espinhais fisiológicas, tais como: escolioses, cifoescolioses e acentuado aumento no grau da cifose torácica (DE SMET *et al.*, 1988).

A osteoporose, também, pode afetar o processo de reparo ósseo (LILL, *et al.*, 2003; XU, *et al.*, 2003). Lill *et al.* (2003) encontraram um atraso do processo de reparo de fraturas em relação a formação, a mineralização e as propriedades mecânicas do calo ósseo em tíbias de ovelhas osteoporóticas; e Xu *et al.* (2003) encontraram alteração dos estágios precoces do reparo de fraturas pela alteração da quantidade e qualidade do calo ósseo.

Neste contexto, há necessidade de desenvolvimento de tecnologias capazes de promover uma melhora do processo de reparo de lesões ósseas em organismos osteoporóticos (LI *et al.*, 1993). Alguns dos tratamentos promissores são os usos de biovidros, vitrocerâmicas e de polímeros, os quais parecem induzir a osteogênese e a melhora das propriedades biomecânicas do calo ósseo (GREENSPAN; ZHONG; LA TORRE, 1995; WHEELER *et al.*, 1998; HENCH; POLAK, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2003).

Uma grande variedade de polímeros biodegradáveis, vidros bioativos e vitrocerâmicas têm sido usados como forma de enxerto para promover uma melhor consolidação de grandes defeitos ósseos (OONISHI *et al.*, 1997). Um dos vidros bioativos mais estudados é o *Biovitro*<sup>®</sup> 45S5 que tem sido conhecido como o vidro bioativo com o maior índice de bioatividade (WHEELER *et al.*, 1998). Recentemente, tem-se desenvolvido um nova vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada de composição quaternária P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> (Biosilicato<sup>®</sup>, patente WO 2004/074199, ZANOTTO *et al.*, 2004). Em um estudo de Moura *et al.* (2007) que compararam o crescimento de células osteogênicas na cultura de células do Biosilicato<sup>®</sup> e *Biovitro*<sup>®</sup> 45S5 não detectaram diferença significativa no conteúdo protéico e da atividade da fosfatase alcalina medidas no 11° e 17° dia, mas a cultura de células do Biosilicato<sup>®</sup> apresentou uma melhor resposta em relação as áreas de matriz calcificada avaliadas no 17° dia. Os resultados indicam que o Biosilicato<sup>®</sup> pode promover aumento *in vitro* da formação de tecido ósseo em um sistema de cultura de células osteogênicas (MOURA *et al.*, 2007).

Da mesma forma, há evidências demonstrando que a Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT) apresenta um efeito positivo em relação ao metabolismo do tecido ósseo e no reparo de fraturas (LUGER *et al.*, 1998; OZAWA *et al.*, 1998). Trelles e Mayayo (1987) encontraram que a radiação laser de HeNe (4mW, 2,4J/cm<sup>2</sup>, 12 sessões), em fraturas de tíbias

de ratos, promoveu um aumento da vascularização e uma aceleração do reparo do tecido ósseo comparado ao grupo controle.

Pinheiro *et al.* (2003) demonstraram que o laser de 830nm (10mW, 4,8J/cm<sup>2</sup>) foi capaz de aumentar a quantidade de tecido ósseo mineralizado em defeitos ósseos de fêmur em ratos. Há também evidências que essa terapia pode estimular o metabolismo do tecido ósseo em ratas osteopênicas (RENNO *et al.*, 2007).

Há poucos estudos que investigaram os efeitos da terapia laser em relação ao reparo de defeitos ósseos em ratas osteopênicas. Os efeitos do Biosilicato<sup>®</sup> de forma isolada ou associada à terapia laser em vivo, também, são desconhecidos. Antes da utilização dessas novas terapias como modalidade terapêutica, há necessidade do conhecimento das respostas desses tratamentos em vivo e dos parâmetros mais adequados para tratamento com o intuito de determinar a sua eficácia e segurança. Neste contexto, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do Biosilicato<sup>®</sup> e da terapia laser sobre as propriedades biomecânicas do calo ósseo de tíbias de ratas osteopênicas.

## 2.2.2- Materiais e Métodos

Este estudo foi conduzido de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e aprovado pelo comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos (n° 025/2006). Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas (19-23°C e ciclo claro/escuro de 12/12) no laboratório de experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno padrão e tiveram livre acesso a água e a ração própria padrão.

Setenta ratas osteopênicas fêmeas da raça Wistar (12 semanas de idade, média de 250g) foram utilizadas e divididas aleatoriamente em 7 grupos com 10 animais em cada: **grupo 1:** controle padrão sem defeito ósseo (CP); **grupo 2:** controle com defeito ósseo sem tratamento (CD); **grupo 3:** defeito ósseo tratado com aplicação de um biomaterial, Biosilicato<sup>®</sup> (B); **grupo 4:** defeito ósseo tratado com laser 60J/cm<sup>2</sup> (L60); **grupo 5:** defeito ósseo tratado com laser 120J/cm<sup>2</sup> (L120); **grupo 6:** defeito ósseo tratado com laser 60J/cm<sup>2</sup> associado ao Biosilicato<sup>®</sup> (B+L60); **grupo 7:** defeito ósseo tratado com laser 120J/cm<sup>2</sup> associado ao Biosilicato<sup>®</sup> (B+L120).

### **2.2.2.1- Procedimento Operatório de Ovariectomia**

A ovariectomia foi realizada bilateralmente por meio de uma incisão translombar sob anestesia de Ketamina/ Xilazina (80/10mg/Kg). A tuba uterina foi suturada e depois da remoção dos ovários, a incisão foi fechada. Depois da operação, todos os animais foram acondicionados durante 60 dias com o propósito de indução da osteopênia (KALU, 1991).

### **2.2.2.2- Procedimento Operatório de Osteotomia**

Sessenta dias após a operação de ovariectomia, as osteotomias foram realizadas na tíbia esquerda dos animais dos grupos experimentais com exceção do grupo CP. O procedimento foi feito sob anestesia de Ketamina/ Xilazina (80/10mg/Kg). As regiões mediais da tíbia foram depiladas digitalmente e desinfetadas com iodopovidona. Incisões nas regiões cutâneas e musculares foram realizadas para expor a tíbia. Um defeito com cavidade de 2,0mm de diâmetro foi realizado por meio de uma minifuradeira com 12.000rpm sob irrigação com solução salina. Nos animais tratados com Biosilicato<sup>®</sup>, as cavidades foram preenchidas com o correspondente biomaterial. O retalho cutâneo foi suturado, e a pele foi desinfetada com iodopovidona. As ratas foram observadas diariamente.

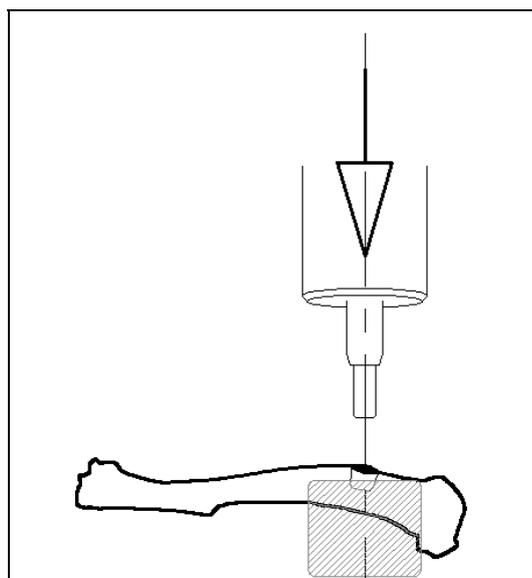
Neste estudo foi utilizado um laser de baixa intensidade (Teralaser<sup>®</sup>, DMC São Carlos, SP, Brazil), 830nm, um feixe de 0,028cm<sup>2</sup>, 100mW, 60J/cm<sup>2</sup> (1,7J) e 120J/cm<sup>2</sup> (3,4J) com um tempo de irradiação de 17s e 34s. A irradiação foi iniciada imediatamente após o procedimento de osteotomia e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo, e décimo segundo dias após a operação. No décimo quarto dia pós-osteotomia, as ratas foram sacrificadas com uma injeção de KCL intra-cardíaca. As tíbias esquerdas foram retiradas para serem analisadas.

### **2.2.2.3- Teste Biomecânico**

As propriedades biomecânicas do calo ósseo foram determinadas por um Teste de Endentação realizado por meio da Máquina de Ensaio Universal Instron (Corporação Instron, MA, modelo 4444) em temperatura ambiente (SHEN *et al.*, 1995; KAMALI *et al.*, 2007; LIND *et al.*, 2008). Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1KN e uma pré-carga de 1N foi aplicada ao teste para evitar deslizamentos dos ossos.

Para a realização do ensaio, a região da osteotomia foi estabilizada por meio de um suporte que evitava movimentos fora do eixo da análise durante o teste. Esse suporte foi preso na parte posterior e laterais do osso, que fixou a osteotomia com sua face voltada para cima de forma estável. Um endentador cilíndrico de 2,0mm de diâmetro foi aplicado ao centro do calo ósseo em uma velocidade constante de 1mm/min. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido ântero-posterior registrando somente a resistência do calo ósseo (Figura 11). A força aplicada e o deslocamento do endentador foram monitorados e registrados por meio de um programa próprio do equipamento (INSTRON Series IX).

Dois parâmetros de penetração do osso foram estabelecidos para verificar as características biomecânicas mais superficiais e mais profundas do osso. O primeiro intervalo utilizado foi o de 0mm a 0,5mm e o segundo de 0mm a 1,0mm de penetração. Desse modo, calcularam-se as curvas de força-penetração para os diversos ensaios em relação a esses dois parâmetros. Com esses dados foram calculados a força máxima (KN) e a energia de absorção ou resistência (J) em cada intervalo determinado.



**Figura 11** – Desenho do Teste de Endentação.

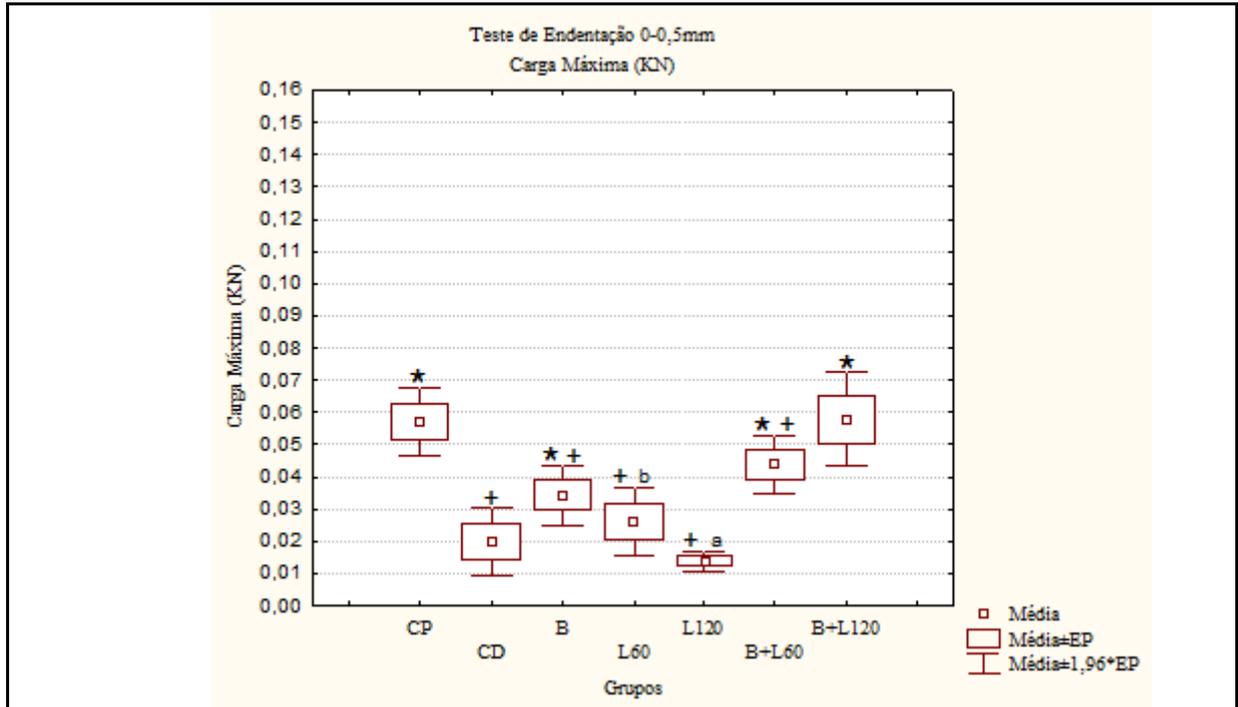
#### 2.2.2.4- Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas dos parâmetros quantitativos estudados; média (M) e erro padrão da média (EPM). Na comparação entre os grupos foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis e, nos casos significantes, o Teste de Mann-Whitney U para discriminar as diferenças. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### 2.2.3- Resultados

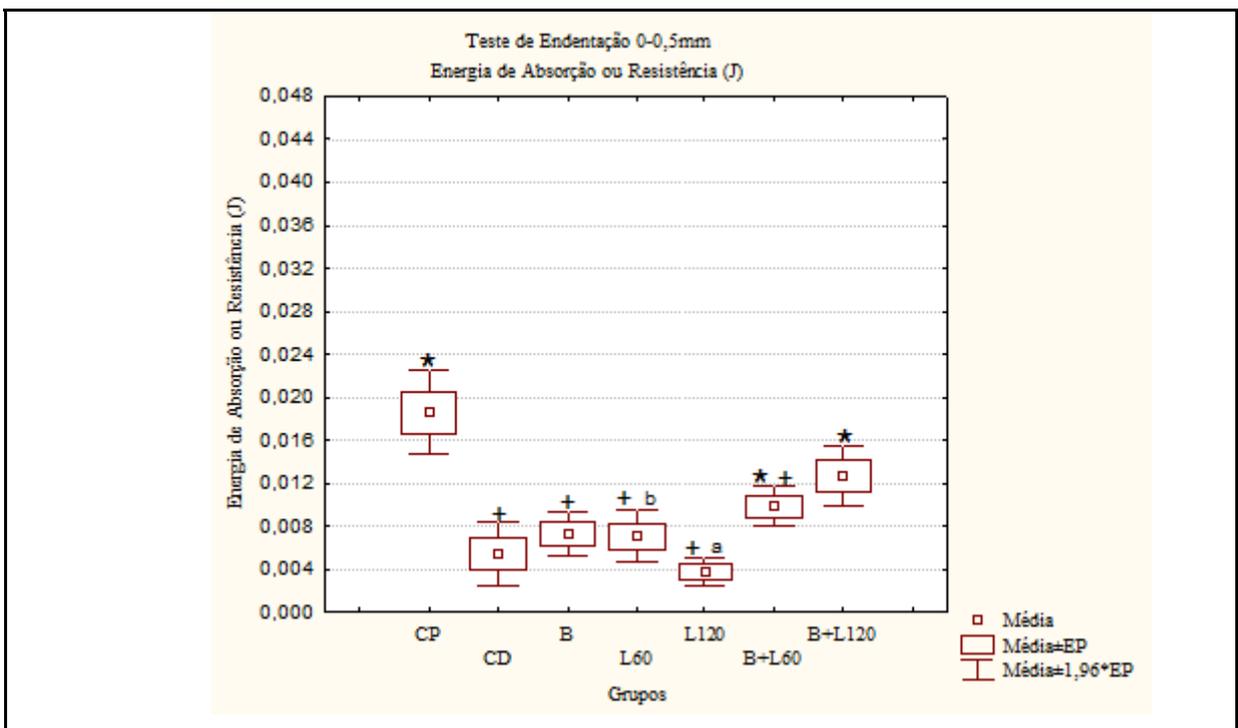
Todas as ratas apresentaram boas condições gerais de saúde após os dois procedimentos operatórios realizados. Houve três fraturas completas da integridade óssea no grupo L120, identificadas no dia do sacrifício. Desta forma, o Teste de Endentação foi realizado em 67 amostras.

A figura 12 representa as médias, o erro padrão e o intervalo de confiança ( $M \pm 1,96*EP$ ) de cada grupo em relação à carga máxima do Teste de Endentação na profundidade de 0-0,5mm. Os grupos CP, B, B+L60 e B+L120 apresentaram valores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) mais elevados em relação ao grupo CD. A carga máxima do Teste de Endentação do grupo B+L120 apresentou resultados maiores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) do que os grupos CD, B, L60, L120 e B+L60. O grupo L60 foi significativamente melhor em relação ao grupo L120. O grupo B+L60 apresentou valores estatisticamente significantes mais elevados em relação ao grupo L60.



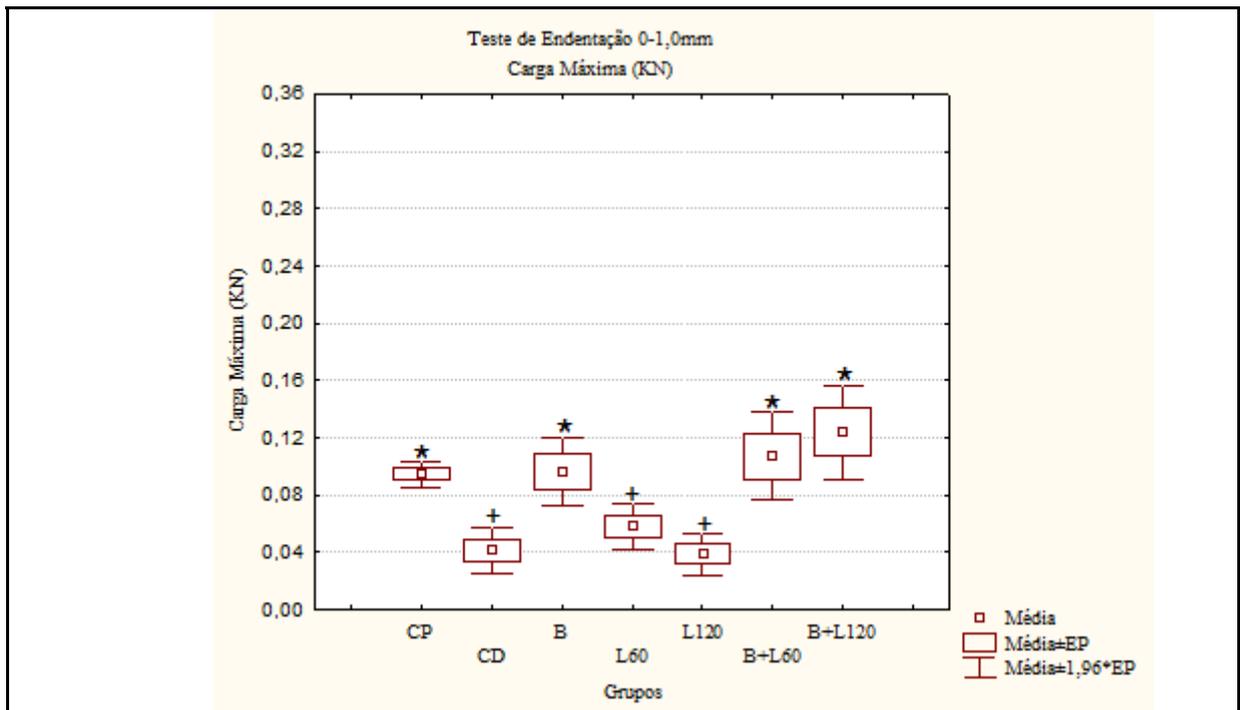
**Figura 12** - Variação da Carga Máxima do Teste de Endentação de 0,5mm,  $p \leq 0,05$ , \* vs grupo CD, + vs grupo B+L120, a vs grupo L60, b vs grupo B+L60

A figura 13 refere se aos dados de energia de absorção ou resistência do Teste de Endentação com 0-0,5mm de profundidade. Pode-se observar que os resultados são semelhantes aos encontrados na análise da carga máxima. A única diferença foi que não houve diferença significativa do grupo B em relação ao grupo CD.



**Figura 13** - Variação da energia de absorção ou resistência do Teste de Endentação de 0,5mm,  $p \leq 0,05$ , \* vs grupo CD, + vs grupo B+L120, a vs grupo L60, b vs grupo B+L6

A figura 14 demonstra as médias, o erro padrão e o intervalo de confiança ( $M \pm 1,96*EP$ ) de cada grupo em relação à carga máxima do Teste de Endentação com profundidade de 0-1,0mm. Os grupos CP, B, B+L60 e B+L120 apresentaram valores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) mais elevados em relação ao grupo CD. A carga máxima do Teste de Endentação do grupo B+L120 apresentou resultados maiores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) do que os grupos CD, L60 e L120.



**Figura 14** - Variação da carga máxima do Teste de Endentação de 1,0mm,  $p \leq 0,05$ , \* vs grupo CD, + vs grupo B+L120

A figura 15 refere se aos dados da energia de absorção ou resistência do Teste de Endentação com profundidade de 0-1,0mm. Pode-se observar que os resultados são semelhantes aos encontrados na análise de carga máxima do mesmo teste. As diferenças encontradas, em relação ao parâmetro anterior, foram a presença de diferença significativa do grupo B+L120 em relação ao grupo B e entre os grupos B+L60 e o L60.

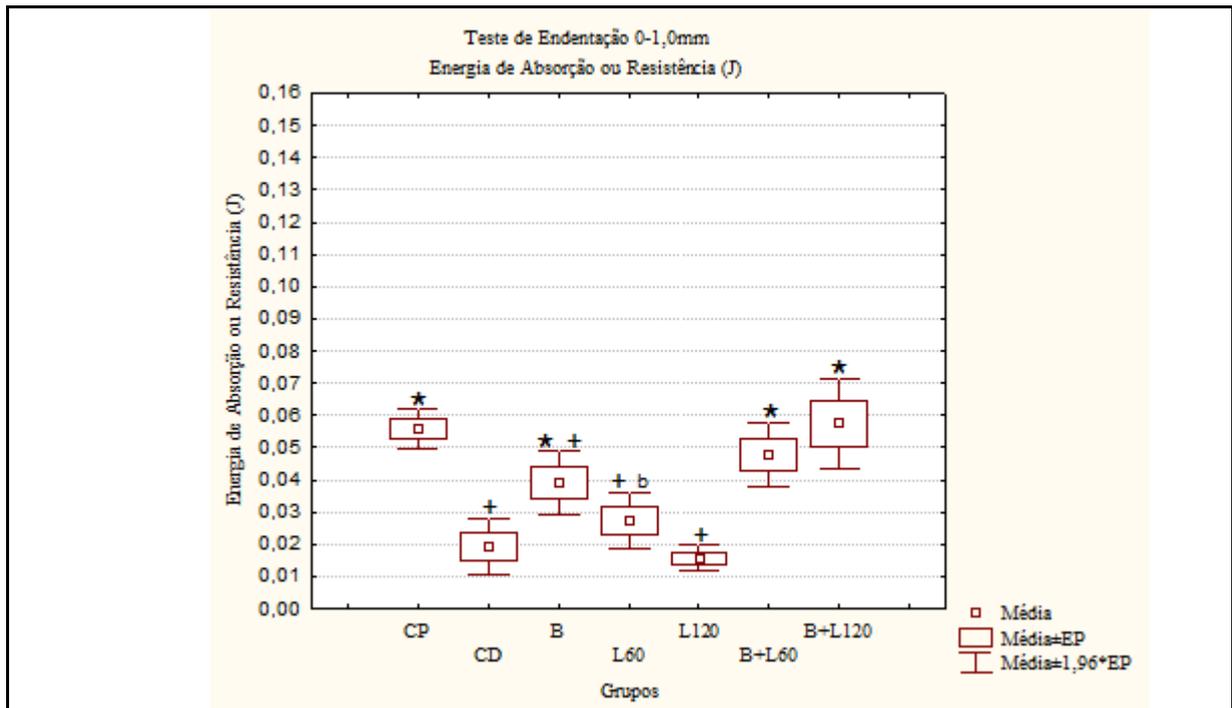


Figura 15 - Variação da energia de absorção ou resistência do Teste de Endentação de 1,0mm,  $p \leq 0,05$ , \* vs grupo CD, + vs grupo B+L120, b vs grupo B+L60

## 2.2.4- Discussão

O método utilizado neste trabalho foi considerado apropriado. O modelo de ovariectomia é considerado um modelo experimental confiável e largamente usado para induzir osteopenia em ratas, com a diminuição da massa óssea e aumento da fragilidade óssea (KALU, 1991; COMELEKOGLU *et al.*, 2007). O Teste de Endentação foi usado para medir os efeitos dos dois tratamentos em relação às propriedades biomecânicas do calo ósseo. Este teste tem sido largamente usado em trabalhos que mediram efeitos de tratamento em uma série de desordens ósseas, incluindo os efeitos do LLLT sobre o reparo de fraturas ósseas (SHEN *et al.*, 1995; KAMALI *et al.*, 2007; LIND *et al.*, 2008). O teste de Endentação avaliou a carga máxima e a energia de absorção. A carga máxima é a maior parâmetro de força registrada no momento da Endentação e a energia de absorção é definida como a medida da quantidade de energia necessária para perfurar o calo ósseo (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; PENG *et al.*, 1994).

Os resultados do Teste de Endentação demonstraram que a aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo, pois houve um aumento da carga máxima e da energia de absorção do osso em relação às profundidades de 0-1,0mm e

em profundidades mais superficiais, 0-0,5mm, houve somente um aumento da carga máxima e não houve alteração da energia de resistência em comparação ao grupo controle com defeito ósseo.

Este aumento das propriedades biomecânicas ocorreu devido ao Biosilicato<sup>®</sup> promover uma melhora do processo reparativo e por formar Hidroxicarbonoapatita em fases iniciais de reparo ósseo (MOURA *et al.*, 2007) que promove uma adequada interface do osso, restabelece a sua estrutura, previne a formação de fibrose e protege a cavidade óssea (HENCH; POLAK, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2003).

Muitos autores têm demonstrado que polímeros biodegradáveis e vidros bioativos apresentam propriedades osteogênicas e podem ser usados como enxertos para defeitos ósseos de grande extensão (OONISHI *et al.*, 1997), principalmente pela facilidade de adaptar a sua estrutura ao defeito, ao seu potencial de estimular a osteogênese e sua capacidade de influenciar o reparo ósseo (VOGEL; VOIGT; GROSS, 2001). Entretanto, o sucesso do implante do material bioativo e a sua ação no processo de reparo ósseo são dependentes das características do biomaterial, como a composição, solubilidade e tamanho do grânulo (SCHEPERS; DUCHEYNE, 1997; MacNEILL *et al.*, 1999).

Em um estudo *in vitro*, foi demonstrado os efeitos osteogênicos do Biosilicato<sup>®</sup> (MOURA *et al.*, 2007). O Biosilicato<sup>®</sup> é uma vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada de sistema quaternário  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$  (RAVAGNANI, 2003). Moura *et al.* (2007) demonstraram que houve um aumento da produção da matriz óssea nas células de crescimento osteogênico associada ao Biosilicato<sup>®</sup>. Os autores sugeriram que poderiam resultar do recrutamento seletivo de células progenitoras obtidas da digestão enzimática do osso calvarial e da estimulação da atividade osteoblástica pelos produtos iônicos distintos liberados pelo Biosilicato<sup>®</sup> (MOURA *et al.*, 2007).

O estudo de Roriz (2005) observou que alvéolos dentários tratados com Biosilicato<sup>®</sup> apresentaram maior formação de tecido mineralizado em comparação aos que não foram tratados. Mas, o estudo de Jabur (2008) não encontrou aumento da formação óssea ao redor de implantes osseointegráveis de titânio aplicados em defeitos ósseos de hemimandíbulas de cães, que foram preenchidos com Biosilicato<sup>®</sup>, porém os autores desse estudo sugerem que não houve melhora do tecido analisado devido a possíveis erros metodológicos, como o modelo experimental e o tamanho do defeito ósseo empregados.

Os grupos com tratamento baseado somente na terapia laser não apresentaram resultados significantes em relação ao grupo controle com defeito. No entanto, o grupo laser com fluência de  $60J/cm^2$  apresentou uma melhor resposta em relação ao grupo laser com

120J/cm<sup>2</sup> na profundidade de 0-0,5mm. Em relação à associação dos tratamentos, o grupo que associou o laser com fluência de 60J/cm<sup>2</sup> obteve uma resposta semelhante ao grupo que utilizou somente a aplicação do Biosilicato<sup>®</sup>, mas o grupo que associou o laser de 120J/cm<sup>2</sup> ao material bioativo apresentou elevadas propriedades biomecânicas comparados aos outros grupos e ao grupo que aplicou somente o Biosilicato<sup>®</sup>. Este aumento das propriedades biomecânicas referiu-se tanto a carga máxima quanto a energia de absorção.

Muitos estudos têm demonstrado que a LLLT é capaz de aumentar a proliferação de células e estimular o metabolismo ósseo (STEIN *et al.*, 2005). A ação da terapia laser é baseada na absorção da luz pelos tecidos, que promoverá uma série de modificações do metabolismo celular. Quando o laser é aplicado ao tecido, a luz é absorvida por fotoreceptores dos cromóforos localizados nas células. A luz absorvida pode modular reações bioquímicas e estimular a respiração mitocondrial, com a produção de oxigênios moleculares e síntese de ATP. Estes efeitos são conhecidos por aumentar a síntese de DNA, RNA e proteínas regulatórias do ciclo celular, que promovem a proliferação celular e aceleração do reparo de defeitos ósseos (TRELLES; MAYAYO, 1987; STEIN *et al.*, 2005).

Neste estudo, é possível que a irradiação laser de 830nm tenha estimulado a diferenciação de células osteoblásticas, que estimulou e acelerou a sua transformação em células maduras e promoveu o aumento da formação óssea que resultou em aumento da carga máxima e da energia de absorção do calo ósseo. O laser de forma isolada não obteve resposta porque não foi capaz de estimular o tecido ósseo o suficiente para gerar uma alteração dos parâmetros biomecânicos do calo, mas quando associado às propriedades osteogênicas do Biosilicato<sup>®</sup>, o tratamento laser com fluência de 120J/cm<sup>2</sup> foi responsável por aumentar os parâmetros biomecânicos do calo ósseo em relação ao grupo controle com defeito ósseo e ao grupo que aplicou o material bioativo de forma isolada.

Os artigos de Guzzardella, Torricelli e Giardino (2003), Pinheiro *et al.* (2003) e Carvalho *et al.* (2006) relatam que a associação da aplicação de biomateriais e da LLLT pode gerar a combinação das propriedades biomecânicas dos biomateriais e intensificar o reparo ósseo estimulado por esses materiais, além de diminuir possíveis efeitos colaterais, como a presença de um maior reação inflamatória no tecido ósseo dos animais tratados. Esses efeitos combinados promovem melhora do reparo ósseo e das propriedades biomecânicas do calo ósseo (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003).

A terapia laser associada à aplicação de biomateriais, além de estimular o processo de reparo ósseo e o maior crescimento do tecido ósseo com conseqüente aumento das propriedades biomecânicas desse tecido (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO,

2003; PINHEIRO *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.* 2006), também pode promover uma melhora do quadro clínico dos pacientes por meio da diminuição da dor e da presença de edemas (OZCELIK; HAYTAC; SEYDAOGLU, 2008).

Pode-se concluir que tratamento laser associado à aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> promoveu uma melhora das propriedades biomecânicas do calo ósseo e pode ser fundamental para a melhora do processo de reparo ósseo de defeitos ósseos de difícil consolidação em humanos.

### 2.2.5- Referências

BIANCHI, M .L.; ORSINI, M. R.; SARAIFOGER, S.; ORTOLANI, S.; RADAELLI, G.; BETTI, S. Quality of live in post-menopausal osteoporosis. **Health Qual Life Outcomes**, v.3, n.78, 2005. Disponível em <http://www.hqo.com/content/3//78> acesso em: 28 de fevereiro de 2009.

CARVALHO, P. T. C.; SILVA I. S.; REIS F. A.; BELCHIOR, A. C. G.; FACCO, G. G.; GUIMARÃES, R. N.; FERNANDES, G. H. C.; DENADAI, A. S. Effect of 650nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. supl. 4, p. 63-68, 2006.

CHICARELLI, M.; RAMOS, F. M. M.; MANZI, F. R.; NOVAES, P. D.; BÓSCOLO, F. N.; ALMEIDA, S. M. Effect of gamma rays on the bone repair process in rats with estrogen deficiency. **Braz Oral Res**, v. 21, n. 1, p. 75-80, 2007.

COMELEKOGLU, U.; BAGIS, S.; YALIN, S.; OGENLER, O.; YILDIZ, A.; SAHIN, O.; OGUZ, I.; HATUNGIL, R. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. **Clin Rheumatol**, v. 26, p. 380-384, 2007.

CULHAN, E. G.; JIMENEZ, H. I.; KING, C. B. K. Thoracic kyphosis, rib mobility, and lung volumes in normal women and women with osteoporosis. **Spine**, v. 19, p. 1250-51, 1994.

DE SMET, A. A.; ROBINSON, R. G.; JOHNSON, B. E.; LUKERT, B. P. Spinal compression fractures in osteoporotic women: patterns and relationship to hyperkyphosis. **Radiology**, v. 166, p. 497-500, 1988.

ENGESAETER, L. B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthop Scand**, v. 49, p. 512-518, 1978.

GREENSPAN, D. C.; ZHONG, J. P.; LA TORRE, G. P. The evaluation of surface structure of bioactive glasses in-vitro. In: WILSON, HENCH, GREENSPAN (Eds.) **Bioceramics**, v. 8. Oxford: Pergamon Press, p. 89-91, 1995.

GUZZARDELLA, G. A.; TORRICELLI, P.; GIARDINO, N. N. A. R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. **Clin Oral Impl Res**, v. 14, p. 226-232, 2003.

HENCH, L. L; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, p. 1016-1017, 2002.

JABUR, R. O. **Avaliação clínica, histológica e histomorfométrica do reparo de defeitos ósseos criados em mandíbula de cães preenchidos com Biovidro® 45S5 ou biosilicato® após a colocação de implantes osseointegráveis.** Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. 88 p.

KAMALI, F.; BAYAT, M.; TORKAMAN, G.; EBRAHIMI, E.; SALAVATI, M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. **J Photochem Photobiol B**, v. 88, p. 11-15, 2007.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone miner**, v. 15, p.171-192, 1991.

KLEIN, R. F.; MITCHEL, S. R.; PHILLIPIS, T. J.; BELKNAP, J. K.; ORWOLL, E. S. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. **J Bone Miner Res**, v.13, p. 1648-56, 1998.

KORSIC, M.; GRAZIO, S. Non-hip peripheral osteoporotic fractures: epidemiology and significance. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 59, p. 53-58, 2008.

LI, P.; OHTSUKI, C.; KOKUBO, T.; NAKANISHI, K.; SOGA, N.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T. Effects of ions in aqueous media on hydroxyapatite induction by silica gel and its relevance to bioactivity of bioactive glasses and glass-ceramics. **J Appl Biomater**, v. 4, p. 221-229, 1993.

LILL, C. A.; HESSELN, J.; SCHLEGEL, U.; ECKHARDT, C.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. **J Orthopaedic Res**, v. 21, n. 5, p. 836-42, 2003.

LIND, M.; LARSEN, A.; CLAUSEN, C.; OSTHER, K.; EVERLAND, H. Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 16, p. 690-698, 2008.

LUGER, E. J.; ROCHKIND, S.; WOLLMAN, Y.; KOGAN, G.; DEKEL, S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, v. 22, p. 97-102, 1998.

MACNEILL, S. R.; COBB, C. M.; RAPLEY, J. W.; GLAROS, A. G.; SPENCER, P. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. **J Clin Periodontol**, v. 26, p. 239-245, 1999.

MELLO, L. C. P.; GOMIDE, L. B. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. **Ver Nutr**, v. 18, n. 5, p. 593-600, 2005.

MOURA, J.; TEXEIRA, L. N.; RAVAGNANI, C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D.; BELOTI, M. M.; PANZERI, H.; ROSA, A. L.; OLIVEIRA, P. T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate<sup>®</sup>). **J Biomed Mater Res A**, v. 82 p. 547-557, 2007.

OONISHI, H.; KUSHITANI, S.; YASUKAWA, E.; IWAKI, H.; HENCH, L.L.; WILSON J.; TSUJI, E.; SUGIHARA, T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clin Orth Rel Res**, v. 334, p. 316-325, 1997.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. **Bone**, v. 22, p. 347-354, 1998.

OZCELIK, O.; HAYTAC, M. C.; SEYDAOGLU, G. Enamel matrix derivate and low-level laser therapy in the treatment of intra-bony defects: a randomized placebo-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 147-156, 2008.

PENG, Z.; TUUKKANEN, H.; ZHANG, H.; JÄMSÄ, T.; VÄÄNÄNEN, H. K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-532, 1994.

PINHEIRO, A. L.; LIMEIRA JÚNIOR, F. DE A.; GERBI, M. E.; RAMALHO, L. M.; MARZOLA, C.; PONZI, E. A.; SOARES, A. O.; DE CARVALHO, L. C.; LIMA, H. C.; GONÇALVES, T. O. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J Clin Laser Med Surg**, v. 21, p. 383-388, 2003.

RENNO, A. C. M.; MCDONNELL, P. A.; PARIZOTTO, N. A.; LAAKSO, E. L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 25, p. 275;280, 2007.

RAVAGNANI, C. **Biosilicato® para promoção da saúde oral**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003. 161 p.

RORIZ, V. M. **Avaliação clínica, histológica de alvéolos dentários de cães preenchidos com biovidro ou Biosilicato®, que posteriormente receberam implantes osseointegráveis**. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006. 105 p.

SCHEPERS, E. J. G.; DUCHEYNE, P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. **J Oral Rehab**, v. 24, p. 171-181, 1997.

SHEN, V.; BIRCHMAN, R.; XU, R.; OTTER, M.; WU, D.; LINDSAY, R.; DEMPSTER, D. W. Effects of reciprocal treatment with estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. **J Clin Invest**, v. 96, p. 2331- 2338, 1995.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 23, p. 161-166, 2005.

SINAKI, M.; WOLLAN, P. C.; SCOTT, R. W.; GELCZER, R.K. Can strong extensor prevent vertebral fractures in women with osteoporosis? **Mayo Clinic Proc**, v. 71, p. 951-56, 1996.

TRELLES, M.A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg Med**, v. 7, p. 36-45, 1987.

VOGEL, M.; VOIGT, C.; GROSS, U.; MUK LLER-MAI, C. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. **Biomaterials**, v. 22, p.357-362, 2001.

XU, S. W.; YU, R.; ZHAO, G. F.; WANG, J. W. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. **Chin J Traumatol**, v. 6, n. 3, p. 160-6, 2003.

WHEELER, D. L.; STOKES, K. E.; HOELLRICH, R. G.; CHAMBERLAND, D. L.; MCLOUGHLIN, S. W. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. **J Biomed Mater Res**, v. 41, p. 527-533, 1998.

ZANOTTO E. D., *et al.* **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments**. Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo. Int. C. C03C10/00, 20, WO2004/074199, 2004.

### 2.3- CONTEXTUALIZAÇÃO DO ESTUDO 2

O estudo 1 encontrou que a aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo e que os grupos que utilizaram somente a terapia laser não obtiveram resultados significativos. A associação dos dois tratamentos apresentou os melhores valores biomecânicos encontrados. Este estudo teve como objetivo avaliar somente as respostas biomecânicas do calo ósseo em uma profundidade de até 1,0mm de penetração, mas não avaliou os dados em relação a regiões ósseas mais profundas do calo ósseo e não obteve informações sobre as regiões íntegras do osso osteotomizado.

As propriedades biomecânicas de um osso osteotomizado são formadas pelas propriedades do calo ósseo e do osso íntegro ao redor do calo, nas extremidades do osso e nas faces laterais e contralateral a osteotomia. O estudo 2 foi realizado com o intuito de avaliar as propriedades biomecânicas do calo ósseo a uma profundidade de 0-1,5mm e as propriedades das regiões ósseas íntegras do osso osteotomizado, por meio de um Teste de Flexão a Três Pontos, após a realização do Teste de Endentação que avaliou as propriedades do calo ósseo. Os dados encontrados nesse estudo representam características mais gerais do osso, pois o osso foi avaliado de forma mais abrangente com valores de resistência do calo ósseo de 0-1,5mm de profundidade e com dados sobre as propriedades biomecânicas das regiões ósseas íntegras das tíbias osteotomizadas

## 2.4- ESTUDO 2

**Título:** A ação do Biosilicato<sup>®</sup> e da Terapia Laser de Baixa Intensidade sobre as propriedades biomecânicas, avaliadas em um teste de Endentação e de Flexão a Três Pontos, de tíbias osteotomizadas em ratas osteopênicas.

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do Biosilicato<sup>®</sup> e da terapia laser sobre o reparo ósseo de ratas osteopênicas. Setenta ratas fêmeas da raça *Wistar* (12-semanas,  $\pm$  250g) foram ovariectomizadas e foram divididas em 7 grupos com 10 animais em cada: controle padrão (CP), controle com defeito ósseo (CD), defeito ósseo tratado com Biosilicato<sup>®</sup> (B), defeito ósseo tratado com radiação de 60J/cm<sup>2</sup> (L60), defeito ósseo tratado com radiação de 120J/cm<sup>2</sup> (L120), defeito ósseo tratado com Biosilicato<sup>®</sup> e radiação de 60J/cm<sup>2</sup> (B+L60), defeito ósseo tratado com Biosilicato<sup>®</sup> e radiação de 120J/cm<sup>2</sup> (B+L120). Sessenta dias após a ovariectomia, as tíbias esquerdas foram osteotomizadas. Nos animais tratados com Biosilicato<sup>®</sup>, a cavidade do defeito ósseo gerado pela osteotomia foi preenchida com o biomaterial. Os animais foram irradiados por sete sessões em dias alternados. No décimo quarto dia após a osteotomia, as ratas foram sacrificadas e as tíbias foram dessecadas. As tíbias foram analisadas por dois testes biomecânicos: o Teste de Endentação com 0-1,5mm de penetração e o Teste de Flexão a Três Pontos. Os dois testes avaliaram a carga máxima e a energia de resistência. A análise estatística foi realizada pelo Teste de Kruskal-Wallis e o Teste de Mann-Whitney U, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Em relação ao Teste de Endentação, os grupos CP, B, B+L60 e B+L120 apresentaram valores estatisticamente significantes mais elevados ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo CD. A carga máxima do Teste de Endentação do grupo B+L120 apresentou resultados estatisticamente significantes maiores ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos grupos CP, CD, B, L60 e L120. A energia de absorção do grupo B+L120 foi maior estatisticamente significante aos grupos CD, L60 e L120. Em relação à carga máxima do Teste de Flexão a Três Pontos, o grupo L60 apresentou resultados estatisticamente significantes mais elevados do que os grupos CP, B, L60, L120, B+L60, B+L120 e não houve diferença estatística em relação à energia de absorção entre os grupos. O Biosilicato<sup>®</sup> promoveu uma melhora das respostas biomecânicas do calo ósseo, o laser com fluência de 60J/cm<sup>2</sup> foi eficaz em aumentar as propriedades biomecânicas do osso adjacente à

região do defeito ósseo e a associação dos dois tratamentos com fluência de 120J/cm<sup>2</sup> apresentou uma melhora das propriedades biomecânicas do calo ósseo.

**Palavras Chaves:** Osteopenia, Reparo Ósseo, Terapia Laser de Baixa Intensidade, Biomaterial, Testes Biomecânicos.

#### 2.4.1- Introdução

O processo menopausal promove uma diminuição da liberação de hormônios estrogênicos e conseqüente aumento da reabsorção óssea e diminuição da massa óssea (MORRI; GENANT, 1998). Esta diminuição dos hormônios estrogênicos também é encontrada após a operação de retirada dos ovários, conhecida como ovariectomia (SHEN *et al.*, 1995).

A diminuição dos hormônios estrogênicos é um dos fatores de risco mais importantes à osteoporose que pode ser definida como a diminuição da massa óssea e deteriorização da microarquitetura tecidual (MORRI; GENANT, 1998; AMADEI *et al.*, 2006).

A morfologia óssea, a qualidade da matriz óssea e o processo de remodelamento ósseo são os principais responsáveis pelas características biomecânicas, que são determinantes a resistência óssea a forças externas (GARNERO; DELMAS, 2004). Logo, a diminuição da massa óssea e a deteriorização da microarquitetura tecidual causam uma diminuição das propriedades biomecânicas ósseas e conseqüente aumento da suscetibilidade a ocorrência de fraturas (MORRI; GENANT, 1998).

Com o avançar da idade, há um aumento do número de mulheres que desenvolvem a osteoporose. Aproximadamente 27% das mulheres com 80 anos são osteoporóticas e 70% são osteopênicas (DENNISON; COOPER, 2000). As fraturas osteoporóticas em comparação as fraturas sem a presença de osteoporose apresentam uma diminuição de 6,07 vezes da capacidade funcional do paciente (JOHNELL; KANIS, 2005).

As regiões que apresentam maior probabilidade de fraturas, associadas à fragilidade óssea causadas pela osteoporose são o quadril, a coluna vertebral, e as regiões distais do antebraço. As características epidemiológicas de cada um desses locais diferem e sugerem a influência de diferentes fatores em cada um, como: a variação da força óssea local, a magnitude da força causadora da lesão, e a frequência de lesões que podem causar fraturas.

As fraturas vertebrais apresentam maior freqüência de ocorrência em T8, T12 e L1, locais que correspondem às regiões mais frágeis da coluna e são mais exigidas biomecanicamente (DENNISON; COOPER, 2000).

A deficiência estrogênica, além de alterar o processo de remodelamento, também pode afetar o processo de reparação óssea (WALSH, *et al.*, 1997; KUBO, *et al.*, 1999; LILL, *et al.*, 2003; XU, *et al.*, 2003). Lill *et al.* (2003) encontraram um atraso do processo de reparo de fraturas em relação a formação, a mineralização e as propriedades mecânicas do calo ósseo em tíbias de ovelhas osteoporóticas. Walsh *et al.* (1997) analisaram as propriedades mecânicas do reparo de fraturas em fêmures de ratas ovariectomizadas e verificaram que houve alteração do processo normal de reparo com duas e quatro semanas, e Xu *et al.* (2003) encontraram alteração dos estágios precoces do reparo de fraturas pela alteração da quantidade e qualidade do calo ósseo.

Neste contexto, há necessidade de avanços biofísicos e bioquímicos na tentativa de melhorar o processo de reparo ósseo e as propriedades biomecânicas ósseas (LUGER *et al.*, 1998; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; SILVA, 2006). Com esse objetivo, destaca-se o uso da Terapia Laser de Baixa Intensidade (LLLT) e dos biomateriais.

Atualmente, os materiais bioativos mais estudados são os vidros bioativos e a vitrocerâmicas que em contato com tecidos vivos reagem e transformam-se em Hidroxicarbonoapatita (HCA), que é um material equivalente a fase mineral inorgânica do osso, devido a essas propriedades são utilizados como implantes para enxertos ósseos (HENCH; POLAK, 2002; MOURA *et al.*, 2007). Recentemente, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido um nova vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada de composição quaternária  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$  (Biosilicato<sup>®</sup>, patente WO 2004/074199, ZANOTTO *et al.*, 2004) que apresenta indícios de apresentar um melhor índice de bioatividade e propriedades mecânicas mais elevadas do que os biovidros convencionais (MOURA *et al.*, 2007). Mas há a necessidade de se verificar as propriedades biomecânicas do biomaterial associados ao índice de bioatividade do processo de reparo ósseo em vivo.

A terapia laser pode promover um estímulo ao reparo ósseo por meio do aumento da quantidade de osso mineralizado (BARUSHKA; YAKKOBI; ORON, 1995; SILVA JUNIOR *et al.*, 2002), da melhora dos aspectos histológicos (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HÖFLING, 2000; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; NICOLAU *et al.*, 2003) e das propriedades biomecânicas (LUGER *et al.*, 1998; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; SILVA, 2006) que podem ser considerado como o principal indicador do processo funcional de reparo ósseo (LUGER *et al.*, 1998). Além disso, a terapia

laser pode favorecer a integração dos biomateriais ao osso e pode incrementar a estimulação do processo reparativo estimulado pelos materiais bioativos.

Desta forma, este trabalho tem o objetivo de quantificar as alterações biomecânicas geradas pela terapia laser e pela utilização do Biosilicato<sup>®</sup>, utilizados associados ou independentemente, em osteotomias de tíbias osteopênicas de ratas.

## 2.4.2- Materiais e Métodos

Este estudo foi conduzido de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e aprovado pelo comitê de Ética Animal da Universidade Federal de São Carlos (n° 025/2006). Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas (19-23°C e ciclo claro/escuro de 12/12) no laboratório de experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno padrão e tiveram livre acesso a água e a ração própria padrão.

Setenta ratas osteopênicas fêmeas da raça *Wistar* (12 semanas de idade, média de 250g) foram utilizadas e divididas aleatoriamente em 7 grupos com 10 animais em cada: **grupo 1:** controle padrão sem defeito ósseo (CP); **grupo 2:** controle com defeito ósseo sem tratamento (CD); **grupo 3:** defeito ósseo tratado com aplicação de um biomaterial, Biosilicato<sup>®</sup> (B); **grupo 4:** defeito ósseo tratado com laser 60J/cm<sup>2</sup> (L60); **grupo 5:** defeito ósseo tratado com laser 120J/cm<sup>2</sup> (L120); **grupo 6:** defeito ósseo tratado com laser 60J/cm<sup>2</sup> associado ao Biosilicato<sup>®</sup> (B+L60); **grupo 7:** defeito ósseo tratado com laser 120J/cm<sup>2</sup> associado ao Biosilicato<sup>®</sup> (B+L120).

### 2.4.2.1- Procedimento Operatório de Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada bilateralmente por meio de uma incisão translombar sob anestesia de Ketamina/ Xilazina (80/10mg/Kg). A tuba uterina foi suturada e depois da remoção dos ovários, a incisão foi fechada. Depois da operação, todos os animais foram acondicionados durante 60 dias com o propósito de indução da osteopênia (KALU, 1991).

#### 2.4.2.2- Procedimento Operatório de Osteotomia

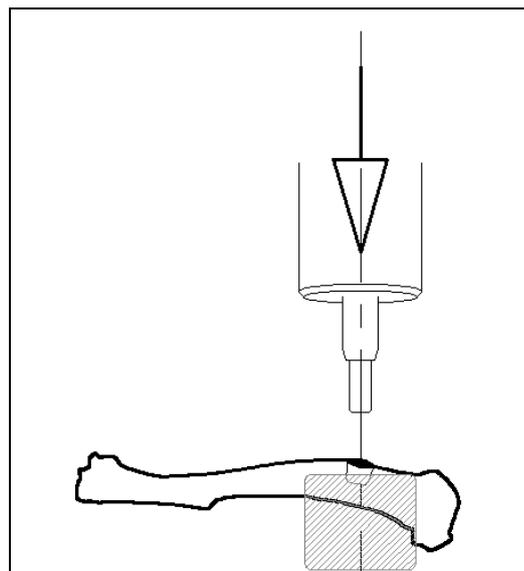
Sessenta dias após a operação de ovariectomia, as osteotomias foram realizadas na tíbia esquerda dos animais dos grupos experimentais com exceção do grupo CP. O procedimento foi feito sob anestesia de Ketamina/ Xilazina (80/10mg/Kg). As regiões mediais da tíbia foram depiladas digitalmente e desinfetadas com iodopovidona. Incisões nas regiões cutâneas e musculares foram realizadas para expor a tíbia. Um defeito com cavidade de 2,0mm de diâmetro foi realizado por meio de uma minifuradeira com 12.000rpm sob irrigação com solução salina. Nos animais tratados com Biosilicato<sup>®</sup>, as cavidades foram preenchidas com o correspondente biomaterial. O retalho cutâneo foi suturado, e a pele foi desinfetada com iodopovidona. As ratas foram observadas diariamente.

Neste estudo foi utilizado um laser de baixa intensidade (Teralaser<sup>®</sup>, DMC São Carlos, SP, Brasil), 830nm, um feixe de 0,028cm<sup>2</sup>, 100mW, 60J/cm<sup>2</sup> (1,7J) e 120J/cm<sup>2</sup> (3,4J) com um tempo de irradiação de 17s e 34s. A irradiação foi iniciada imediatamente após o procedimento de osteotomia e no segundo, quarto, sexto, oitavo, décimo, e décimo segundo dias após a operação. No décimo quarto dia pós-osteotomia, as ratas foram sacrificadas com uma injeção de KCL intra-cardíaca. As tíbias esquerdas foram retiradas para serem analisadas.

#### 2.4.2.3- Teste Biomecânico

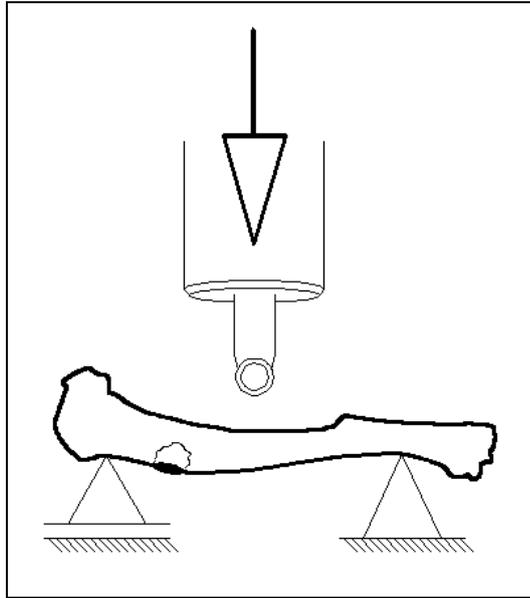
As propriedades biomecânicas do osso foram determinadas por dois testes em uma Máquina de Ensaio Universal Instron (Corporação Instron, MA, modelo 4444) em temperatura ambiente. Foram realizados o Teste de Endentação (SHEN *et al.*, 1995; KAMALI *et al.*, 2007; LIND *et al.*, 2008) e o Teste de Flexão a Três Pontos (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; PENG *et al.*, 1994). O primeiro avaliou as propriedades biomecânicas do calo ósseo e a aderência de sua interface ao osso. O segundo foi realizado após o término do primeiro teste e analisou as propriedades biomecânicas do osso de forma geral, sem considerar a resistência e a aderência do calo ósseo que foram utilizadas no primeiro teste.

Para a realização do Teste de Endentação, foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 1 KN e pré-carga de 1N. O osso foi fixo por meio de um suporte que sustentava as regiões posteriores e laterais do osso de forma que a osteotomia se posicionasse com a sua face voltada para cima com estabilidade e sem movimentos adicionais (Figura 16). Um endentador cilíndrico de 2,0mm de diâmetro foi aplicado ao centro do calo ósseo em uma velocidade constante de 1mm/min. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido ântero-posterior registrando somente a resistência do calo ósseo, com profundidade de penetração de 1,5mm a partir da pré-carga. Em relação ao grupo CP, o endentador foi aplicado a 10mm da superfície articular da tíbia. A força aplicada e o deslocamento do endentador foram monitorados e registrados por meio de um programa próprio do equipamento (INSTRON Series IX). As curvas de força-penetração, a força máxima (KN) e a energia de absorção ou resistência (J) do calo ósseo foram calculadas.



**Figura 16** – Desenho do Teste de Endentação.

Para a realização do Teste de Flexão a Três Pontos, foi utilizado uma pré-carga de 5N e uma velocidade constante de 5mm/min. As extremidades da tíbia ficaram apoiadas em dois suportes com distâncias de 21,70mm entre eles e a osteotomia foi posicionada na face contralateral a compressão promovida ao osso e entre os suportes. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterio-anterior, por uma haste cilíndrica até a fratura do osso (Figura 17). A força aplicada e o deslocamento do endentador foram monitorados e registrados por meio de um programa próprio do equipamento (INSTRON Series IX). As curvas de força-deformação, a carga máxima (KN) e a energia de absorção ou resistência (J) foram calculadas.



**Figura 17** – Desenho do Teste de Flexão a Três Pontos.

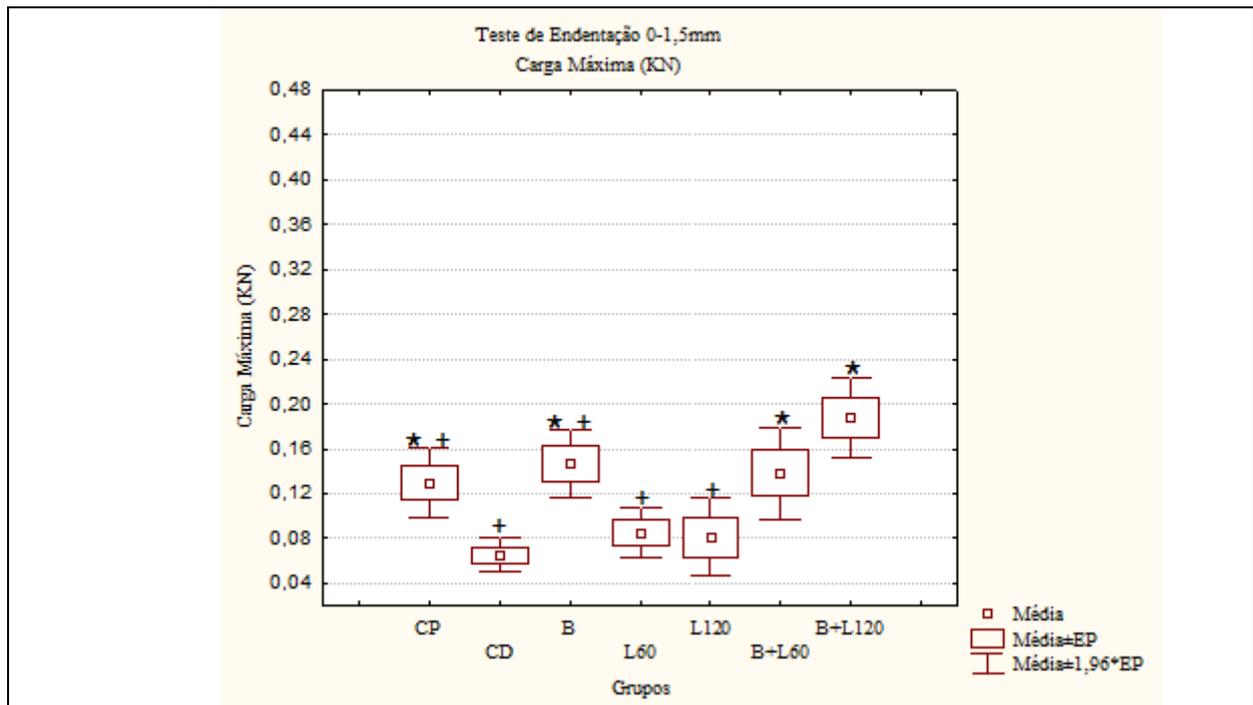
#### **2.4.2.4- Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de técnicas descritivas dos parâmetros quantitativos estudados; média (M) e erro padrão da média (EPM). Na comparação entre os grupos foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis e, nos casos significantes, o Teste de Mann-Whitney U para discriminar as diferenças. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### **2.4.3- Resultados**

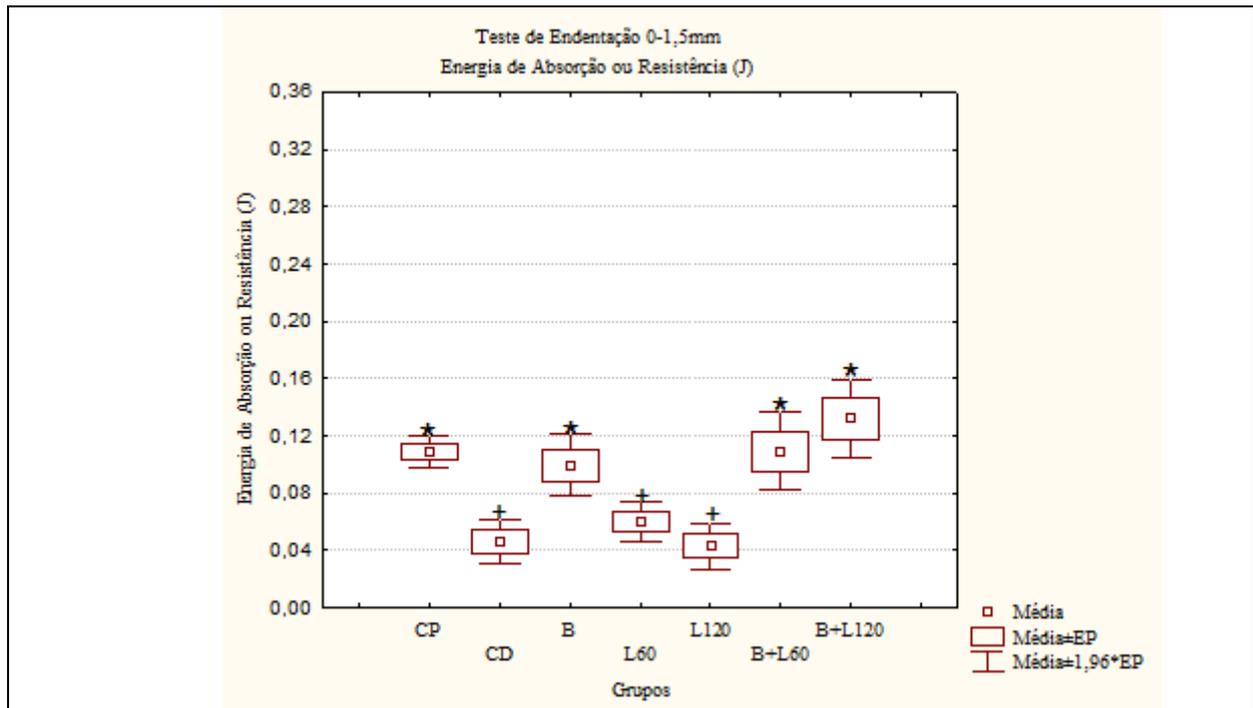
Todas as ratas apresentaram boas condições gerais de saúde após os dois procedimentos operatórios realizados. Houve três fraturas completas no grupo L120, identificadas no dia do sacrifício e uma amostra do grupo B sofreu uma ruptura completa da integridade óssea após o Teste de Endentação. Desta forma, o Teste de Endentação foi realizado em 67 amostras e o Teste de Flexão a Três Pontos foi realizado em 66 amostras.

A figura 18 demonstra as médias, o erro padrão e o intervalo de confiança ( $M \pm 1,96*EP$ ) de cada grupo em relação à carga máxima do Teste de Endentação. Os grupos CP, B, B+L60 e B+L120 apresentaram valores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) mais elevados em relação ao grupo CD. A carga máxima do Teste de Endentação do grupo B+L120 apresentou resultados maiores estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos grupos CP, CD, B, L60 e L120.



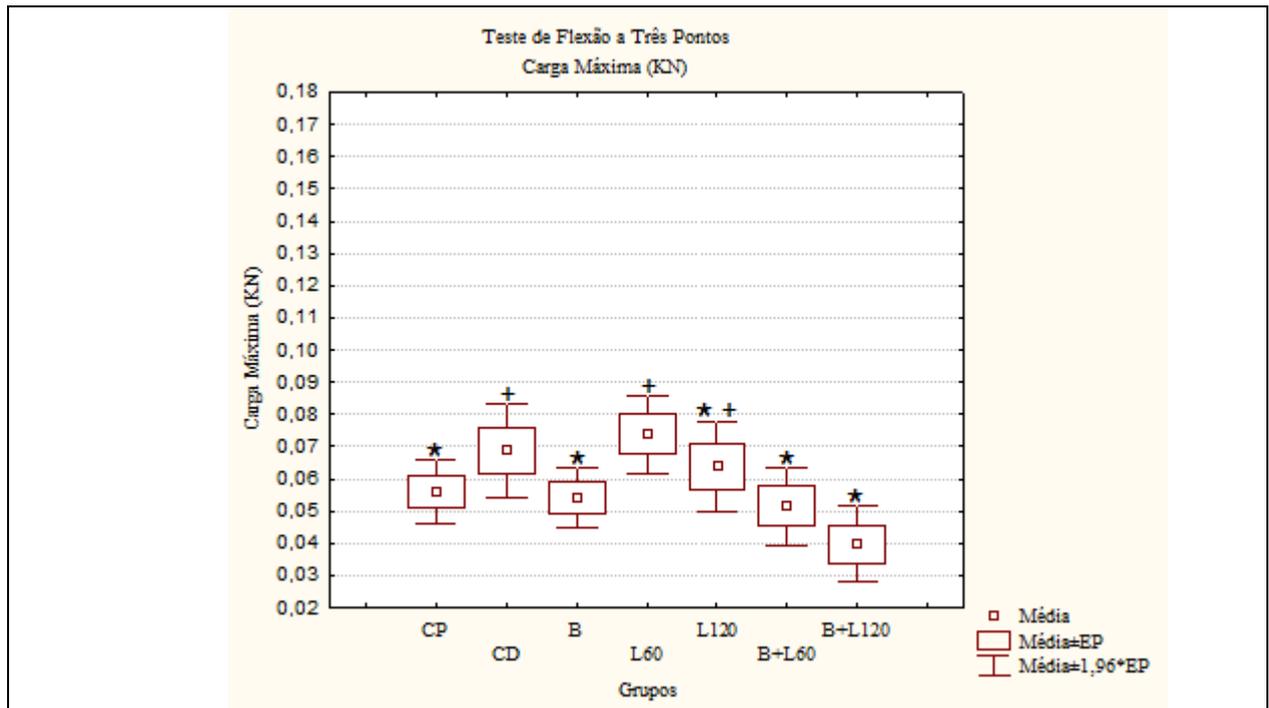
**Figura 18** - Variação da carga máxima do Teste de Endentação  
 $p \leq 0,05$ , \* vs grupo CD, + vs grupo B+L120

A figura 19 refere se aos dados de energia de absorção do Teste de Endentação. Pode-se observar que os resultados são semelhantes aos encontrados na análise da carga máxima. A única diferença foi que não houve diferença estatística significativa do grupo B+L120 em relação aos grupos CP e B.



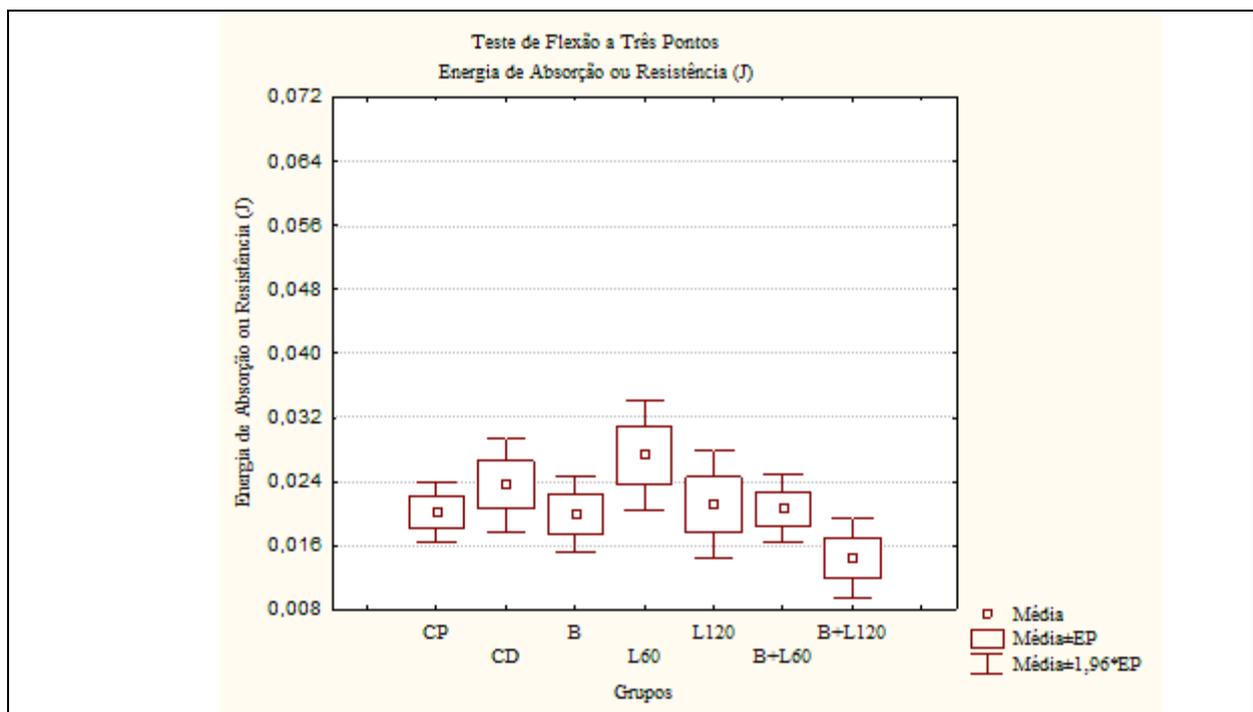
**Figura 19** - Variação da energia de absorção ou resistência do Teste de Endentação  $p \leq 0,05$ , \* vs grupo CD, + vs grupo B+L120

A figura 20 demonstra as médias, o erro padrão e o intervalo de confiança ( $M \pm 1,96*EP$ ) de cada grupo em relação à carga máxima do Teste de Flexão a Três Pontos. Os grupos CP, B, L120 e B+L60 não apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao grupo CD. O grupo L60 apresentou resultados estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ) mais elevados do que os grupos CP, B, L120, B+L60, B+L120. O grupo B+120 obteve resultados menores estatisticamente significantes em relação aos grupos CD, L60 e L120.



**Figura 20** - Variação da carga máxima do Teste de Flexão a Três Pontos  
 $p \leq 0,05$ , \* vs grupo L60, + vs grupo B+L120

Conforme demonstra a figura 21 não houve diferença estatística significativa entre os grupos, em relação à energia de absorção ou resistência do teste de Flexão a Três Pontos.



**Figura 21** - Variação da energia de absorção ou resistência do Teste de Flexão a Três Pontos

#### 2.4.4- Discussão

O osso é considerado uma das estruturas mais duras do corpo, logo apresenta a função de proteção e sustentação. O comportamento biomecânico do osso normal sob a influência de forças e momentos é afetado pelas suas propriedades mecânicas e características geométricas. Forças e momentos podem ser aplicados em uma estrutura óssea em varias direções, e podem produzir tensões, compressões, curvaturas, torções, forças de cisalhamento e efeitos combinados. Os ossos nos seres vivos estão sujeitos a essas influências mecânicas diariamente (NORDIN; FRANKEL, 1989).

Os ossos osteopênicos, pós-ovarectomia, apresentam reduções da área cortical e das propriedades biomecânicas, como a diminuição da carga máxima e da dureza analisados em um teste mecânico (RENNO *et al.*, 2006; COMELEKOGU *et al.*, 2007). Os ossos osteopênicos, por apresentarem menores propriedades biomecânicas são mais suscetíveis a fraturas (SORNAY-RENU *et al.*, 2005; ; RENNO *et al.*, 2006; PASCO *et al.*, 2006; COMELEKOGU *et al.*, 2007).

Após uma fratura, ocorre um processo de reparo ósseo com objetivo de restaurar a forma e a função do osso (HOLLINGER; WONG, 1996). O calo ósseo torna-se mais frágil na fase inicial de reparação (LUGER *et al.*, 1998), fato observado neste estudo em relação aos resultados do Teste de Endentação que apresentou menores valores estatisticamente de carga máxima e energia de absorção do grupo CD em relação ao grupo CP.

As propriedades biomecânicas de um osso que está em processo de reparo ósseo são oriundas de dois fatores. O primeiro refere se às propriedades biomecânicas do calo ósseo associadas à interação da interfase do calo ósseo ao osso intacto. O segundo fator está relacionado às propriedades das regiões ósseas íntegras ao redor do calo, nas extremidades do osso e nas faces laterais e contralateral a osteotomia. Essas regiões podem ser alteradas pelo processo de reparo ósseo (NORDIN; FRANKEL, 1989).

Esses dois fatores foram analisados separadamente por meio do Teste de Endentação que analisou as propriedades biomecânicas do calo ósseo e da interface calo-osso, e do Teste de Flexão a Três Pontos que analisou as propriedades das regiões ósseas íntegras das tíbias osteotomizadas, sem considerar a região do calo ósseo que foi utilizado no primeiro teste.

O primeiro teste realiza uma compressão sobre a região do calo ósseo que gera uma força de cisalhamento sobre o tecido. O segundo teste realiza uma combinação de duas respostas no tecido, a primeira resposta é uma compressão na região óssea que ficou com a sua face voltada para cima no teste, a região íntegra, e a segunda é uma tensão na face que ficou voltada para baixo na realização do teste, a face osteotomizada e que também foi avaliada no Teste de Endentação (NORDIN; FRANKEL, 1989).

A aplicação isolada do Biosilicato<sup>®</sup> promoveu uma melhora das respostas biomecânicas do calo ósseo e não alterou as propriedades biomecânicas das regiões ósseas íntegras, avaliadas no Teste de Flexão a Três Pontos.

O Biosilicato<sup>®</sup> é uma vitrocerâmica bioativa completamente cristalizada de sistema quaternário  $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$  que quando imerso em um meio aquoso promove a liberação de íons seguido por uma reação de policondensação que produz HCA superficialmente. O crescimento de uma camada de HCA na superfície do material promove um ambiente ideal para a reação de colonização de osteoblastos, seguido pela proliferação e diferenciação celular para a formação de um novo osso. A HCA é absorvida pela formação óssea e conforme ocorre essa absorção, a vitrocerâmica reage e se transforma em mais HCA. A liberação de íons do biomaterial promove uma solução iônica que estimula a atração, diferenciação e proliferação de osteoblastos (HENCH; POLAK, 2002; MOURA *et al.*, 2007 ). Logo, a aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> promove o restabelecimento da integridade óssea e favorece a resistência a cargas mecânicas pela formação de HCA, e ainda, promove uma estimulação do crescimento ósseo. O estudo de Roriz (2005) observou que alvéolos dentários tratados com Biosilicato<sup>®</sup> apresentaram maior formação de tecido mineralizado em comparação aos que não foram tratados.

O tratamento laser de forma isolada não promoveu alteração estatística significativa dos parâmetros biomecânicos do calo ósseo em comparação ao grupo CD. Em relação às características biomecânicas avaliadas das regiões ósseas íntegras, foi observado que a fluência de  $60J/cm^2$  e  $120J/cm^2$  não alteraram a energia de resistência do osso, mas a fluência de  $60J/cm^2$  promoveu um aumento de resistência da carga máxima apresentada pelas amostras em relação a todos os grupos menos ao grupo CD. Este dado representa uma tendência do grupo L60 em apresentar uma melhora das propriedades biomecânicas das regiões ósseas íntegras.

O estudo de Renno *et al.* (2006) avaliou as propriedades biomecânicas de tíbias ostepênicas tratadas com laser de GaAlAs com 830nm, 100mW e fluências de  $60J/cm^2$  e  $120J/cm^2$ . Os autores encontraram melhora das propriedades biomecânicas do osso com a

fluência de 120J/cm<sup>2</sup>. O estudo de Lirani-Galvão *et al.* (2006) avaliou as propriedades biomecânicas de tíbias osteotomizadas, por meio de um Teste de Flexão a Três Pontos realizado de forma isolada, tratadas com um laser de GaAlAs, com 780nm, 30mW e fluência de 112,5J/cm<sup>2</sup> e encontrou melhora das propriedades biomecânicas avaliadas pelo grupo tratado com laser. Este estudo avaliou tíbias osteopênicas e osteotomizadas tratadas com 830nm, 100mW e fluências de 60J/cm<sup>2</sup> e 120J/cm<sup>2</sup>. A fluência de 60J/cm<sup>2</sup> apresentou uma tendência de melhora da resistência da carga máxima das regiões ósseas íntegras. Este resultado em comparação aos outros estudos demonstra que existe uma grande particularidade dos parâmetros do laser em função das características apresentadas pelo receptor do tratamento, pois as condições patológicas estudadas geram respostas diferentes dos melhores parâmetros do laser. A tíbia osteopênica e não osteotomizada apresentou como melhor parâmetro 120J/cm<sup>2</sup> (RENNO *et al.*, 2006), a tíbia normal osteotomizada, 112,5J/cm<sup>2</sup> (LIRANI-GALVÃO *et al.*, 2006) e a tíbia osteopênica e osteotomizada, 60J/cm<sup>2</sup>.

A LLLT pode promover uma estimulação do tecido ósseo osteopênico e do processo de reparo ósseo por meio de uma intensificação de diversos fatores do metabolismo ósseo sem alterar as suas fases. Há fases que envolvem o mecanismo de elaboração de matriz óssea pelos osteoblastos (OZAWA *et al.*, 1998; KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003) e outras que são responsáveis pela reabsorção, por meio de osteoclastos, com a finalidade de promover um processo de remodelação óssea (GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003). Com o aumento da elaboração de matriz óssea há um aumento das propriedades biomecânicas e com o processo de reabsorção há uma diminuição dessas propriedades. O aumento do volume associado à organização do tecido ósseo mineralizado são responsáveis pelo aumento da capacidade óssea em resistir a forças externas (NINOMIYA *et al.*, 2007).

Associado a essas variações há alterações dos níveis de Atividade Fosfatase Alcalina (GUZZARDELA *et al.*, 2002, STEIN *et al.*, 2005), Osteopontina (STEIN *et al.*, 2005), a Osteocalcina (OZAWA *et al.*, 1998), Sialoproteína (STEIN *et al.*, 2005), Oxido Nítrico (GUZZARDELA *et al.*, 2002), Ciclo-Oxigenase 2 (MATSUMOTO *et al.*, 2009), expressão do gene *Osteoglycin* (MATSUI; TSUJIMOTO; MATSUSHIMA, 2007) e produção de Proteínas de Choque de Calor, *Heat Shock Protein*, para defesa contra os radicais hidróxido liberados pela irradiação laser (HAMAJIMA *et al.*, 2003). Estas alterações são determinantes sobre os aspectos funcionais ósseos, como as propriedades biomecânicas que apresentam maiores valores devido à estimulação do reparo ósseo (LUGER *et al.*, 1998) e aos aspectos clínicos que, também, são atenuados com o tratamento, como a diminuição em

relação à queixa de dores e a presença de edemas (OZCELIK; HAYTAC; SEYDAOGLU, 2008).

A associação da terapia laser, em relação às fluências de 60J/cm<sup>2</sup> e 120J/cm<sup>2</sup>, e do Biosilicato<sup>®</sup> apresentou uma melhora das propriedades biomecânicas do calo ósseo em comparação ao grupo controle com defeito ósseo. O grupo irradiado com 120J/cm<sup>2</sup> associado ao Biosilicato<sup>®</sup> apresentou os maiores valores das propriedades biomecânicas analisadas do calo ósseo entre todos os grupos e inclusive os outros grupos tratados com o biomaterial. O grupo B+L60 não apresentou resposta em relação ao grupo B, logo pode se afirmar que a dose de 120J/cm<sup>2</sup> foi a única capaz de promover acréscimo da resposta do material bioativo em relação ao calo ósseo.

Atualmente com base nos mecanismos estimulatórios do tratamento laser, propôs-se a utilização dessa terapia como meio de promover uma melhora do processo de osteointegração por meio de aspectos histomorfométricos, como o aumento da deposição óssea na interface biomaterial-osso (GUZZARDELLA *et al.*, 2003) e da elaboração do colágeno (PINHEIRO *et al.*, 2003). O Biosilicato<sup>®</sup> produz uma base inorgânica de HCA, que necessita de um processo de colonização de osteoblastos, seguido pela proliferação e diferenciação celular para formação de um novo osso, logo o laser torna-se uma forma de tratamento eficaz como meio de aumentar a interação do biomaterial com o osso por meio do aumento de células ósseas, da produção de colágeno, da formação de matriz óssea, e da intensificação do processo de angiogênese (GUZZARDELLA *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2006).

A análise biomecânica das regiões ósseas íntegras não encontrou diferenças estatísticas significantes entre os grupos em relação à energia de absorção, mas o grupo B+L120 apresentou uma diminuição do parâmetro de carga máxima em comparação ao grupo CD. Essa diminuição pode ser explicada devido à elevada resistência demonstrada por esse grupo ao Teste de Endentação, fato que pode ter fragilizado as amostras para a realização do segundo teste, o Teste de Flexão a Três Pontos. Esta resposta não foi esperada, pois o sacrifício foi realizado com 14 dias e dados da literatura demonstram que neste período as osteotomias apresentam-se em uma fase inicial de reparo ósseo com o início do surgimento de tecido ósseo organizado, mas ainda sem restabelecer a sua integridade óssea (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HÖFLING, 2000; OZCELIK; HAYTAC; SEYDAOGLU, 2008) que gera valores biomecânicos mais baixos de resistência no local do defeito ósseo (LUGER *et al.*, 1998).

A aplicação isolada do Biosilicato<sup>®</sup> aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo, mas a sua associação com o tratamento laser gerou um aumento ainda maior das propriedades biomecânicas do calo ósseo o que pode ter fragilizado o osso no momento do teste de Endentação, apesar desse teste ser conhecido por gerar poucos danos ao material analisado e poder ser aplicado antes de outros testes biomecânicos, com reduzidos prejuízos a estes (NORDIN; FRANKEL, 1989), e do teste de Flexão a Três Pontos, neste estudo, apresentar como a maior estrutura de resistência ao teste a cortical contralateral ao defeito ósseo que não foi utilizada no Teste de Endentação.

Pode-se concluir que o Biosilicato<sup>®</sup> melhora as propriedades biomecânicas do calo ósseo e não altera as propriedades das regiões ósseas íntegras. O laser de forma isolada não altera a resistência do calo ósseo e tende a melhorar as regiões ósseas íntegras e que a associação dos dois tratamentos com fluência de 120J/cm<sup>2</sup> melhora as propriedades biomecânicas do calo ósseo de forma muito elevada. Logo se pode escolher o melhor tratamento, conforme a necessidade do paciente em melhorar o calo ósseo ou as regiões ósseas íntegras do osso fraturado.

#### 2.4.5- Referências

AMADEI, S. U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n.1, p. 5-12, 2006.

BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of Low-Energy Laser (He-Ne) Irradiation on the Process of Bone Repair in Rat Tibia. **Bone**, v. 16, n.1, p. 47-55, 1995.

CARVALHO, P. T. C.; SILVA I. S.; REIS F. A.; BELCHIOR, A. C. G.; FACCO, G. G.; GUIMARÃES, R. N.; FERNANDES, G. H. C.; DENADAI, A. S. Effect of 650nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. supl. 4, p. 63-68, 2006.

COMELEKOGLU, U.; BAGIS, S.; YALIN, S.; OGENLER, O.; YILDIZ, A.; SAHIN, O.; OGUZ, I.; HATUNGIL, R. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. **Clin Rheumatol**, v. 26, p. 380-384, 2007.

DENNISON, E.; COOPER, C. Epidemiology of osteoporotic fractures. **Horm Res**, v. 54, n. suppl 1, p. 58-63, 2000.

ENGESAETER, L. B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthop Scand**, v. 49, p. 512-518, 1978.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Laser effects on osteogenesis. **Appl Surf Sci**, v. 154-155, p. 548-554, 2000.

GARAVELLO-FREITAS; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO P. P.; PADOVANI, C. R.; DAL PAI-SILVA, M.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Low-power laser irradiation improves histomorfometrical parameters and bone matriz organization during tibia wound healing in rats. **J Photochem Photobiol B**, v. 70, p. 81-89, 2003.

GARNERO, P.; DELMAS, P. D. Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women. **J Musculoskel Neuron Interact**, v. 4, n. 1, p. 50-63, 2004.

GUZZARDELLA, G. A.; FINI, M.; TORICELLI, P. GIAVARESI, G. GIARDINO, R. Laser Stimulation on Bone Defect Healing: Na In Vitro Study. **Lasers Med Sci**, v. 17, p. 216-220, 2002.

GUZZARDELLA, G. A.; TORRICELLI, P.; GIARDINO, N. N. A. R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. **Clin Oral Impl Res**, v. 14, p. 226-232, 2003.

HAMAJIMA, S.; HIRATSUKA K.; KIYAMA-KISHIKAWA, M.; TAGAWA, T.; KAWAHARA, M.; OHTA, M.; SASAHARA, H.; ABIKO, Y. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. **Lasers Med Sci**, v. 18, p. 78-82, 2003.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, p. 1016-1017, 2002.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. K. The integrated processes of hard tissue regeneration with especial emphasis on fracture healing. **Oral Surg Med Oral Pathol**, v. 82, n. 6, p. 594-606, 1996.

JOHNEEL, O.; KANIS, J. Epidemiology of osteoporotic fractures. **Osteoporos Int**, v. 16, p. S3-S7, 2005.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v. 15, p. 171-192, 1991

KAMALI, F.; BAYAT, M.; TORKAMAN, G.; EBRAHIMI, E.; SALAVATI, M. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. **J Photochem Photobiol B**, v. 88, p. 11-15, 2007.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of Low-Energy Laser Irradiation on Bone Remodeling During Experimental Tooth Movement in Rats. **Lasers Surg Med**, v. 26, p. 282-291, 2000.

KUBO, T.; SHIGA, T.; HASHIMOTO, J.; YOSHIOKA, N.; HONGO, H.; URABE, M.; KITAJIMA, I.; SAMBA, I.; HIRASAWA, Y. et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 68, n. 5-6, p. 197-202, 1999.

LILL, C. A.; HESSELN, J.; SCHLEGEL, U.; ECKHARDT, C.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. **J Orthopaedic Res**, v. 21, n. 5, p. 836-42, 2003.

LIND, M.; LARSEN, A.; CLAUSEN, C.; OSTHER, K.; EVERLAND, H. Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**, v. 16, p. 690-698, 2008.

LIRANI-GALVÃO A. P.; JORGETTI, V.; SILVA, O. L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 6, p. 735-40, 2006.

LUGER, E. J.; ROCHKIND, S.; WOLLMAN Y.; KOGAN G.; DEKEL S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, v. 22, p. 97-102, 1998.

MATSUI, S.; TSUJIMOTO, Y.; MATSUSHIMA, K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 1, p. 27-31, 2007.

MATSUMOTO, M.A.; FERINO, R.V.; MONTELEONE, G.F.; RIBEIRO, D.A. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. **Lasers Med Sci**, v.24, n. 2, p. 195-201, 2009.

MORRI, H.; GENANT, H. K. Statement on the diagnosis and management of osteoporosis from the Consensus Development Conference at the Second International Conference on Osteoporosis, Osaka 1997. **J Bone Miner Metabol**, v. 16, p. 206-214, 1998.

MOURA, J.; TEXEIRA, L. N., RAVAGNANI, C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; BELOTI, M.M.; PANZERI, H.; ROSA, A.L.; OLIVEIRA, P.T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). **J Biomed Mater Res.**, v. 88A, n. 3, p. 545-557, 2007.

NICOLAU, R.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M. T. T.; REIS, L. M. ZÂNGARO, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**, v. 18, p. 89-94, 2003.

NINOMIYA, T.; HOSOYA, A.; NAKAMURA, H.; SANO, K.; NISHISAKA, T.; OZAWA, H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. **Bone**, v. 40, p. 140-148, 2007.

NORDIN, M.; FRANKEL, V. H., Biomechanics of bone, In: NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System**. 2.ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 1989, p. 3-31.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. **Bone**, v. 22, p. 347-354, 1998.

OZCELIK, O.; HAYTAC, M. C.; SEYDAOGLU, G. Enamel matrix derivate and low-level laser therapy in the treatment of intra-bony defects: a randomized placebo-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 147-156, 2008.

PASCO, J. A.; SEEMAN, E.; HENRY, M. J.; MERRIMAN E. N.; NICHOLSON, G. C.; KOTOWICZ, M. A. The population burden of fractures originates in women with osteopenia, not osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 17, p. 1404-1409, 2006.

PENG, Z.; TUUKKANEN, H.; ZHANG, H.; JÄMSÄ, T.; VÄÄNÄNEN, H. K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-532, 1994.

PINHEIRO A. L.; LIMEIRA JÚNIOR F. DE A.; GERBI M. E.; RAMALHO L. M.; MARZOLA C.; PONZI E. A.; SOARES A. O.; CARVALHO L. C.; LIMA H. C.; GONÇALVES T. O. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with

inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J Clin Laser Med Surg**, v. 21, p. 383–388, 2003.

RENNO, A. C. M.; MOURA, F. M.; SANTOS, N. S. A. S.; TIRICO, R. P.; BOSSINI, P. S.; PARIZOTTO, N. A. Effects of 830-nm Laser, Used in two Doses, on Biomechanical Properties of Osteopenic Rat Femora. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 2, p. 202-206, 2006.

RORIZ, V. M. **Avaliação clínica, histológica de alvéolos dentários de cães preenchidos com biovidro ou Biosilicato<sup>®</sup> que posteriormente receberam implantes osseointegráveis.** Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006. 105 p.

SHEN, V.; BIRCHMAN, R.; XU, R.; OTTER, M.; WU, D.; LINDSAY, R.; DEMPSTER, D. W. Effects of reciprocal treatment with estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. **J Clin Invest**, v. 96, p. 2331- 2338, 1995.

SILVA JÚNIOR, A. N.; PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G.; WEISMANN, R.; RAMALHO, L. M. P.; NICOLAU, R. A. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg**, v. 20, n. 2, p. 83-87, 2002.

SORNAY-RENDU, E.; MUNOZ, F.; GARNERO, P.; DUBOEUF, F.; DELMAS, P. D. Identification of osteopenic women at high risks of fracture: the OFELY Study. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 10, p.1813-19, 2005.

STEIN A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 23, p. 161-166, 2005.

WALSH, W. R.; SHERMAN, P.; HOWLETT, C. R.; SONNABND, D. H.; EHRLICH, M. G. Fracture healing in rat osteopenia model. **Clin Orthop**, v. 342, p. 218-27, 1997.

XU, S. W.; YU, R.; ZHAO, G. F.; WANG, J. W. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. **Chin J Traumatol**, v. 6, n. 3, p. 160-6, 2003.

ZANOTTO E. D., *et al.* **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments.** Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo. Int. C. C03C10/00, 20, WO2004/074199, 2004.

**3- TERCEIRA PARTE**

### 3- TERCEIRA PARTE

#### 3.1- DISCUSSÃO GERAL

O comportamento biomecânico do osso depende de suas propriedades mecânicas e características geométricas (NORDIN; FRANKEL, 1989). As fraturas interrompem a continuidade óssea, e modificam as características ósseas, que tornam o osso mais frágil as demandas biomecânicas de sua função biológica até o completo reparo ósseo (NORDIN; FRANKEL, 1989; LUGER *et al.*, 1998).

Neste estudo foi verificado que as propriedades biomecânicas do calo ósseo, no período de 14 dias após a osteotomia, representadas pela carga máxima e energia de absorção do osso osteotomizado e não tratado eram menores estatisticamente ao osso não osteotomizado, em todos os parâmetros de análise do Teste de Endentação. Estes valores diminuídos das propriedades biomecânicas do grupo CD promovem uma maior fragilidade óssea às tíbias.

Com aproximadamente 14 dias após uma osteotomia ou fratura em ratos, o calo ósseo ainda não apresenta uma fase adiantada de reparo ósseo, com o início do surgimento de tecido ósseo organizado (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HOFLING 2000; CARVALHO *et al.*, 2006), mas sem restabelecer sua completa função biomecânica (LUGER *et al.*, 1998; GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003).

O estudo de Freitas, Baranauskas e Cruz-Hofling (2000) encontrou, após 15 dias da realização de uma osteotomia de 2mm de diâmetro em ratos da linhagem *Wistar* de 250 a 300 gramas, uma formação óssea trabecular oriunda de um tecido ósseo primário sem clara visualização da linha de osteoblastos.

O estudo de Carvalho *et al.* (2006) encontrou, após 14 dias de osteotomia de 1,6mm de diâmetro em ratos da linhagem *Wistar* com 230 a 350 gramas, uma evidente cavidade formada pela lesão óssea com a presença de vasos sanguíneos recém formados, infiltrado inflamatório, e baixa concentração de osteoblastos em relação ao grupo sem tratamento.

Os parâmetros biomecânicos ósseos dependem das propriedades das estruturas encontrados no osso, como: a quantidade de matriz calcificada, a composição e o arranjo espacial dos cristais ósseos, a quantidade e a organização das fibras de colágeno, as lamelas e

as propriedades geométricas (rede trabecular, macroestrutura do córtex, e a estrutura cortical) (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003). A largura do osso cortical e a área cortical são importantes parâmetros da avaliação da qualidade do osso cortical e da força de resistência óssea, pois definem os parâmetros de resistência óssea. (COMELEKOGU *et al.*, 2007).

O estudo de Luger *et al.* (1998), que realizou uma fratura tibial completa com fixação interna por fio de *Kirschner* em ratos da linhagem *Wistar* com média de 400g, relatou que com duas semanas, os calos ósseos se apresentavam muito imaturos, com quatro semanas, a força do calo ósseo se assemelhava ao osso íntegro e com seis semanas, a fratura estava totalmente unida e exibia um tecido ósseo plenamente restabelecido. Apesar de o calo ósseo estar muito imaturo com duas semanas, é importante quantificar as características biomecânicas, pois indicam a fragilidade óssea em resposta a possíveis demandas do cotidiano, informação que favorece o processo de recuperação do paciente, e permite uma comparação entre os tratamentos.

As propriedades biomecânicas das regiões ósseas íntegras, sem considerar a região do calo ósseo que foi utilizado no Teste de Endentação, do grupo controle com defeito ósseo apresentaram dados similares ao grupo controle padrão. Este fato demonstra que o processo de reparo ósseo de um rato osteopênico não altera as propriedades biomecânicas gerais do osso, pois a carga máxima e a energia de absorção avaliadas no Teste de Flexão a Três Pontos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controles osteotomizado e não osteotomizado, após o Teste de Endentação ser realizado em ambos os grupos.

O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do Laser de Baixa Intensidade e do Biosilicato<sup>®</sup>, utilizados independentemente ou associados, sobre o reparo ósseo em ratas osteopênicas. O primeiro dado encontrado foi que a aplicação isolada do Biosilicato<sup>®</sup> aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo, principalmente em relação às maiores profundidades avaliadas, pois houve um aumento da carga máxima e da energia de absorção do osso em relação às profundidades de 0-1,0mm e 0-1,5mm e em profundidades mais superficiais, 0-0,5mm, houve somente um aumento da carga máxima e não houve alteração da energia de resistência em comparação ao grupo controle.

Pode se observar que a utilização desse biomaterial aumentou as propriedades biomecânicas do osso osteotomizado por promover um aumento da resistência do calo ósseo. Este aumento das propriedades biomecânicas está relacionado com a formação de uma camada de HCA (MOURA *et al.*, 2007), que previne a formação de fibrose e protege a

cavidade óssea, além de poder promover uma adequada interfase do osso e restabelecer a sua estrutura (HENCH; POLAK, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2003). O biomaterial, também, pode promover uma melhora do processo reparativo (MOURA *et al.*, 2007).

O estudo de Jabur (2008) avaliou a formação de tecido ósseo, por meio de diferentes tipos de substitutos ósseos, ao redor de implantes osseointegráveis de titânio aplicados em defeitos ósseos de hemi-mandíbulas de cães. Os defeitos foram preenchidos com Bioglass<sup>®</sup> 45S5, Biosilicato<sup>®</sup> e osso autógeno. Após 18 semanas, os cães foram sacrificados e suas hemi-mandíbulas removidas e submetidas a análises histológicas e histomorfométricas. Não foram encontrados resultados estatisticamente significantes em relação a nenhum grupo tratado analisado em comparação ao grupo controle, que não recebeu nenhuma forma de tratamento. Os autores sugeriram que não houve melhora dos tratamentos analisados, devido a possíveis erros metodológicos, como o modelo experimental e o tamanho do defeito ósseo empregado.

O estudo de Roriz (2005) avaliou histologicamente o Biosilicato<sup>®</sup> implantado em alvéolos dentais. Os autores observaram que os alvéolos tratados com esse biomaterial apresentaram maior formação de tecido mineralizado em comparação aos que não foram tratados. Os resultados sugerem que o Biosilicato<sup>®</sup> pode ser biocompatível ao osso e que aplicado ao alvéolo dental pode aumentar a formação óssea, após o processo de extração dental.

O estudo de Moura *et al.* (2007) comparou o crescimento de células osteogênicas em uma cultura de células com Biosilicato<sup>®</sup> e uma com Biovitro<sup>®</sup> 45S5 e não encontrou diferenças significantes em relação ao conteúdo protéico e da Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP) avaliadas no 11<sup>o</sup> e 17<sup>o</sup> dia, mas foi encontrado um aumento significativo das áreas de matriz calcificada avaliadas no 17<sup>o</sup> dia no grupo com Biosilicato<sup>®</sup>. O Biosilicato<sup>®</sup> além de apresentar melhores propriedades mecânicas por ser uma vitrocerâmica em comparação a um biovidro, também apresentou um melhor índice de bioatividade caracterizado por esse aumento significativo das áreas de matriz calcificada. Os autores desse estudo sugeriram que esse aumento do índice de bioatividade poderia resultar da estimulação da atividade osteoblástica pelos produtos iônicos distintos liberados pelo Biosilicato<sup>®</sup> em comparação aos biovidros convencionais.

A estimulação promovida pelos biovidros convencionais ocorre pela exposição dos osteoblastos humanos primários a solução iônica provinda da reação dos biovidros com meios aquosos. Sete famílias de genes são estimuladas após 48 horas da aplicação do biomaterial (XYNOS *et al.*, 2001). Esses genes ativos aumentam a expressão de algumas

proteínas que influenciam a diferenciação e a proliferação de osteoblastos como: fatores de transcrição, reguladores do ciclo celular, moléculas de transdução de sinal, proteínas envolvidas na síntese de DNA, fatores de crescimento, citocinas que influenciam a resposta inflamatória, receptores, antígenos da superfície celular, componentes da matriz extracelular e reguladores de apoptose (XYNOS *et al.*, 2001; HENCH; POLAK, 2002).

As melhores propriedades mecânicas dos biomateriais favorecem o processo de osteointegração, pois o local de implantação pode gerar estresse mecânico ao biomaterial e ao processo de osteointegração, estímulo que pode causar rupturas, e pode ocasionar a falha da utilização desse produto, logo quanto melhor as características biomecânicas menor a probabilidade de falha da utilização desse biomaterial (BENAQQA *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação dos biovidros e das vitrocerâmicas compostos por  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  e  $\text{P}_2\text{O}_5-\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ , ocorrem quando imersos em um meio aquoso e envolve a liberação de íons  $\text{Na}^+$  com a sua substituição por  $\text{H}^+$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$ , seguido por uma reação de policondensação de silanol que produz uma camada superficial de sílica gel que evolui para HCA biologicamente reativa que é equivalente a fase mineral inorgânica do osso (HENCH; POLAK, 2002; MOURA *et al.*, 2007).

O crescimento de uma camada de HCA na superfície do material proporciona um ambiente ideal para a reação de colonização de osteoblastos, seguidos pela proliferação e diferenciação celular com o intuito de formar um novo osso. Nesse processo, o biomaterial deverá ser absorvido na velocidade em que o novo osso é formado (HENCH; POLAK, 2002).

Essa camada de HCA é uma das principais responsáveis pelo aumento das propriedades biomecânicas do calo ósseo em fases iniciais de reparo ósseo (NORDIN; FRANKEL, 1989; HENCH; POLAK, 2002), quando ocorre a aplicação de materiais bioativos ósseos, em comparação ao processo normal de reparo ósseo (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003; KHADRA<sup>1</sup> *et al.*, 2004, CARVALHO *et al.*, 2006). Os grupos que aplicaram o Biosilicato<sup>®</sup> apresentaram maiores valores biomecânicos do que o grupo controle com defeito ósseo. Esses valores são gerados pela presença de HCA e também pelas características osteogênicas desse material bioativo que podem promover maior deposição de tecido ósseo (MOURA *et al.*, 2007; RORIZ, 2005).

A aplicação isolada do Biosilicato<sup>®</sup> não alterou as propriedades biomecânicas das regiões ósseas integras ao redor do calo e das extremidades do osso sem considerar a região osteotomizada, avaliados no Teste de Flexão a Três Pontos por meio dos parâmetros de carga máxima e energia de absorção.

Em relação ao tratamento laser aplicado de forma isolada, não houve alteração dos parâmetros biomecânicos do calo ósseo em nenhuma das profundidades analisadas, pois não houve acréscimos biomecânicos em relação ao grupo CD. O grupo L60 obteve resultados maiores significativamente do que o grupo L120 em relação à carga máxima e a energia de absorção do Teste de Endentação na profundidade de 0-0,5mm, mas não diferiu do grupo CD.

Estes dados não representam que esse tratamento não promoveu uma melhora do processo de reparo ósseo, mas que os grupos irradiados não apresentaram diferenças biomecânicas significativas, devido à fase de inicial de reparo ósseo (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HOFLING 2000; CARVALHO *et al.*, 2006) apresentados por esses grupos. Mas, pode-se verificar uma tendência do grupo irradiado em apresentar indícios de melhora das propriedades biomecânicas pelo fato do grupo L60 ter apresentado uma melhor resposta do que o grupo L120 e pelo grupo L60 apresentar um maior valor de média do que o grupo CD.

A LLLT pode promover uma estimulação do processo de reparo ósseo por meio de uma intensificação em diversos fatores do metabolismo ósseo, mas apesar de aumentar o metabolismo ósseo, não promove uma alteração das etapas necessárias ao reparo ósseo, mecanismo diferente do Biosilicato<sup>®</sup> que em fases iniciais promove a deposição de HCA. Esta diferença de mecanismos pode ser responsável pelos grupos com aplicação do material bioativo apresentar diferenças significativas nos testes realizados e da terapia laser de forma isolada não apresentar essas diferenças significativas, pois a formação de HCA promove um aumento inicial das propriedades biomecânicas do calo ósseo e a estimulação laser apesar de poder promover uma melhora do processo de reparo ósseo, essa melhora pode não ter sido detectada pelo teste biomecânico, devido à fase inicial de reparo ósseo apresentado pelos ossos (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HOFLING 2000; CARVALHO *et al.*, 2006), mas conforme relatado anteriormente, apresentaria indícios de um início de melhora das propriedades biomecânicas.

A irradiação promove uma estimulação óssea que ocasiona um aumento de osteoblastos diferenciados (NICOLAU *et al.*, 2003), principalmente observados em fases iniciais do processo de reparo ósseo (PINHEIRO *et al.*, 2001; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; KHADRA<sup>1</sup> *et al.*, 2004). Com o aumento do número dessas células, há conseqüente aumento da deposição de matriz óssea (GUZZARDELLA *et al.*, 2002; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; NICOLAU *et al.*, 2003), Ca (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995; GUZZARDELLA *et al.*, 2002, KHADRA<sup>1</sup> *et al.*, 2004), P

(DÖRTBUDAK; HAAS; MAILATH-POKORNY, 2000; KHADRA<sup>1</sup> *et al.*, 2004) e proteínas (KHADRA<sup>1</sup> *et al.*, 2004, MATSUI; TSUJIMOTO; MATSUSHIMA, 2007).

O estímulo gerado por meio da terapia laser, também, pode ocasionar um aumento do número de osteoclastos e das áreas de absorção óssea (KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; NICOLAU *et al.*, 2003), ou a diminuição dessas células (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995; NINOMIYA *et al.*, 2007). A ocorrência dessa variação de dados depende principalmente da etapa analisada do reparo ósseo, pois o processo de reparo inclui diferentes fases e apresenta diferenças de acordo com o tipo, intensidade do trauma e também da extensão dos danos ao osso (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002). Há fases que envolvem o mecanismo de elaboração de matriz óssea pelos osteoblastos (OZAWA *et al.*, 1998; KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003) e outras que são responsáveis pela reabsorção, por meio de osteoclastos, com a finalidade de promover um processo de remodelação óssea (GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003). Esses fatores são determinantes para as diferenças encontradas em relação ao aumento ou diminuição do número de osteoclastos e osteoblastos, mas indiferentemente a esse dado, observa-se melhora do processo reparativo por meio da terapia laser (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995; KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003; NICOLAU *et al.*, 2003; NINOMIYA *et al.*, 2007).

Com o aumento da elaboração de matriz óssea há um aumento das propriedades biomecânicas e com o processo de reabsorção há uma diminuição dessas propriedades. O aumento do volume e da organização do tecido ósseo mineralizado são responsáveis pelo aumento da capacidade óssea em resistir a forças externas (NINOMIYA *et al.*, 2007).

O estudo de Khadra<sup>2</sup> *et al.* (2004) demonstrou que a terapia laser promoveu um aumento da força biomecânica sobre a região da interface entre um implante metálico e o osso. Esse aumento pode ser explicado por meio do crescimento do contato do tecido ósseo ao implante, originado pelo aumento da deposição de matriz óssea calcificada, Ca e P.

Devido às diferentes respostas biomecânicas que o processo de reparo ósseo pode apresentar, dependendo da fase de deposição ou reabsorção, a terapia laser pode ter melhorado o processo de reparo ósseo, mas não foi suficiente para favorecer a detecção das diferenças, no teste estatístico, entre os grupos que utilizaram a terapia laser de forma isolada com o grupo controle com defeito ósseo, em relação às propriedades biomecânicas do calo ósseo.

A energia fornecida pela terapia laser pode aumentar a organização das fibras de colágeno (GARAVELLO-FREITAS, *et al.*, 2003) que constituem a matriz orgânica do osso (GARNERO, *et al.*, 2006). No estudo de Garavello-Freitas *et al.* (2003) os grupos irradiados apresentaram uma melhor organização das fibras de colágeno, com presença de fibras do tipo I, características dos tecidos ósseos maduros, após o 14º dia de pós-operatório.

A composição óssea é formada por uma grande quantidade de materiais inorgânicos, combinados a uma matriz orgânica. Os componentes inorgânicos do osso são responsáveis pelas características de dureza e rigidez do osso, enquanto a matriz orgânica é responsável pelas características de flexibilidade e ductibilidade. O colágeno contribui com as forças que resistem à flexão, compressão e tensão sobre o osso (GARNERO, *et al.*, 2006; KOTHA; GUZELSU, 2007).

O estudo de Freitas, Baranauskas e Cruz-Hofling (2000) encontrou, após 15 dias da realização da osteotomia, em uma análise descritiva do grupo não irradiado, uma formação óssea trabecular, oriunda de um tecido ósseo primário sem clara visualização da linha de osteoblastos. A análise dos grupos irradiados encontrou o início do aparecimento de áreas secundárias de formação óssea, os quais apresentavam lamelas concêntricas de osso recém formado ao redor de vasos sanguíneos.

Em relação ao estudo de Freitas, Baranauskas e Cruz-Hofling (2000), foram realizadas osteotomias de 2mm de diâmetro em tíbias de ratos, da raça *Wistar*, com massa de 250 a 300 gramas. Outros dados relevantes são que os ratos foram irradiados todos os dias a partir de 24 horas após a osteotomia. A irradiação foi realizada por um laser de HeNe, com comprimento de onda de 633nm, 1mW de potência, feixe de irradiação de 1,1mm de diâmetro e fluências de 3,15J/cm<sup>2</sup>, 31,5J/cm<sup>2</sup> e 94,7J/cm<sup>2</sup>. Os grupos com fluências de 31,5J/cm<sup>2</sup> e 94,7J/cm<sup>2</sup> apresentaram melhora das respostas histológicas e o grupo com 3,15J/cm<sup>2</sup> não apresentou diferença do grupo controle. As semelhanças com este estudo refere se ao mesmo tamanho da osteotomia e do rato, mas a terapia laser difere muito da realizada neste trabalho. Neste trabalho foi utilizado um laser de Ga-Al-As, com comprimento de onda de 830nm, emissão contínua, potência de saída de 100mW, densidade de potência de 3,57W/cm<sup>2</sup>, área do feixe de 0,028 cm<sup>2</sup> e fluências de 60J/cm<sup>2</sup> e 120J/cm<sup>2</sup> com energias de 1,7J e 3,4J depositadas no tecido.

O estudo de Carvalho *et al.* (2006) encontrou, após 14 dias de osteotomia de 1,6mm, a presença de tecido conjuntivo bem vascularizado rico em fibroblastos, trabéculas ósseas recém formadas e osteoblastos em relação ao grupo irradiado. O grupo sem tratamento apresentou uma evidente cavidade formada pela lesão óssea com a presença de vasos

sanguíneos recém formados, infiltrado inflamatório, e baixa concentração de osteoblastos. Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* com 230 a 350 gramas. A irradiação foi realizada por um laser de GaAlAs, com comprimento de onda de 650nm, 50mW de potência, área do feixe de 0,1cm<sup>2</sup> e fluência de 4J/cm<sup>2</sup>. O estudo de Carvalho *et al.* (2006) também apresenta similaridades a este estudo em relação ao tempo de sacrifício após a osteotomia e ao tamanho do rato e da osteotomia, mas difere em relação a dosimetria do tratamento laser utilizado.

Foi encontrado em diversos estudos, o crescimento do número de células ósseas, promovidos pela terapia laser, associado ao aumento da quantidade de marcadores de diferenciação osteoblástica, como a ALP (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995; OZAWA *et al.*, 1998; GUZZARDELLA *et al.*, 2002; STEIN *et al.*, 2005), a Osteopontina (OPN) (STEIN *et al.*, 2005), a Osteocalcina (OC) (OZAWA *et al.*, 1998) e a Sialoproteína (BSP) (STEIN *et al.*, 2005).

Os osteoblastos apresentam uma grande variedade de morfologias desde pré-osteoblastos a osteoblastos maduros. Cada estágio de maturação é caracterizado pela expressão de proteínas específicas: a ALP é expressa nos estágios primários, a OPN e a BSP são expressos nos estágios pós-proliferativos e a OC é expressa em osteoblastos maduros (AUBIN; LIU, 1996; LIU, 1997; MALAVAL *et al.*, 1999). Logo, o aumento da atividade da ALP sugere um efeito da irradiação laser sobre o desenvolvimento primário da maturação de osteoblastos e o aumento de OPN, BSP e OC sugerem fases mais posteriores do processo reparativo.

Um mecanismo envolvido no processo de estimulação do laser sobre o processo de reparo ósseo é o aumento da expressão de Ciclo-Oxigenase 2 (COX-2) (MATSUMOTO *et al.*, 2009). A Ciclo-Oxigenase (COX) é uma enzima chave na conversão do ácido aracídico em prostaglandinas, e duas formas têm sido identificadas: a Ciclo-Oxigenase 1 (COX-1) e a COX-2. A COX-1 é expressa em muitos tecidos e promove a síntese de prostaglandinas requerida para as funções fisiológicas normais. A COX-2 não é normalmente detectável em tecidos saudáveis, mas é rapidamente induzida por estímulos mitogênicos como nos processos reparativos, ou pró-inflamatórios (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HÖFLING, 2000; HAMAJIMA *et al.*, 2003).

Da mesma forma que a irradiação laser é capaz de aumentar o suprimento sanguíneo, por meio da liberação de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (TSUJII *et al.*, 1998), e estimular a proliferação e a diferenciação celular (SATO *et al.*, 1997; DEMPKE *et al.*, 2001), acredita-se que a maior liberação de COX-2 poderia ajudar no processo de reparo ósseo (MATSUMOTO *et al.*, 2009). Sato *et al.*

(1997) relatam que a COX-2 poderia estar envolvida com o processo de osteogênese, associado a maturação de osteoblastos e Zhang *et al.* (2002) afirma que essa substância atua sobre a formação de osteoblastos .

Outro mecanismo do processo de reparo ósseo foi observado por Matsui, Tsujimoto e Matsushima (2007) em um estudo em que foi irradiado células humanas da polpa dentária. O estudo encontrou aumento da liberação de  $\text{OH}^-$ , conforme o aumento da energia laser oferecida ao tecido. A  $\text{OH}^-$  está relacionada aos processos de apoptose, inflamação, dano ao DNA e envelhecimento. No grupo que ocorreu a maior liberação de  $\text{OH}^-$ , também apresentou um aumento da liberação de Proteínas de Choque de Calor 27, *Heat Shock Protein 27* (HSP27), o qual é um mecanismo de resposta contra um possível dano celular causado pela liberação de  $\text{OH}^-$ , que é expresso especificamente em osteoblastos e também está relacionado ao processo de formação do tecido ósseo. Associado a um aumento na liberação de HSP27 ocorreu um aumento do número de nódulos ósseos calcificados, da ALP e da expressão dos genes de Proteínas Morfogenéticas Ósseas 2 e 4 (BMP-2 e BMP-4) neste estudo. Quando essa mesma dosimetria do laser foi utilizada e a liberação de  $\text{OH}^-$  foi neutralizada, não houve melhora do processo de reparo ósseo. Logo pode se considerar necessário a liberação de  $\text{OH}^-$  como mecanismo estimulatório do laser em reparos ósseos (MATSUI; TSUJIMOTO; MATSUSHIMA, 2007).

A terapia laser, também, pode promover a liberação de mais um radical livre associado ao reparo ósseo, o Óxido Nítrico (NO) (GUZZARDELLA *et al.*, 2002). Este radical livre de curta duração é associado ao crescimento osteoblástico (RALSTON; TODD; HELFRICH, 1994) e a inibição do processo de reabsorção ósseo, fatores que modificam o processo de remodelação e reparo ósseo (BRANDI *et al.*, 1995).

Em relação aos mecanismos de expressão gênica, o estudo de Hamajima *et al.* (2003) analisou 3800 genes e selecionou os que demonstraram um aumento de expressão de no mínimo duas vezes, após duas horas da irradiação laser, e foi encontrado que o gene *Osteoglycin/mimecan* apresentou uma expressão 2,3 vezes maior do que no grupo não irradiado. *Osteoglycin* é um membro da classe das Proteoglicanas Ricas em Pequenas Leucinas, *Small Leucine-Rich Proteoglycan* (SLRP), encontrado na matriz extracelular em tecidos conectivos e é denominado como um fator de osteoindução. As SLRP são conhecidas por interagir com o colágeno e regular a fibrogênese, um processo necessário para o desenvolvimento do reparo ósseo (HOCKING; SHINOMURA; McQUILLAN, 1998).

Outros dois genes, também, apresentaram aumento da expressão gênica devido ao estímulo da irradiação laser, o gene da manutenção minicromossômica, (MCM-3), o qual

refere-se estar associado ao processo de replicação cromossômica (YAMAMOTO *et al.*, 2001) e o gene *Annexin III* que está relacionado ao crescimento de células osteoblásticas nos estágios precoces de crescimento ósseo em ratos (YAMAMOTO; KAWAHARA; ABIKO, 2002).

Estas diversas alterações metabólicas promovem uma melhora do processo de reparo ósseo e são determinantes em relação aos aspectos funcionais do osso, como as propriedades biomecânicas (LUGER *et al.*, 1998; GUZZARDELLA *et al.*, 2002; MATSUI; TSUJIMOTO; MATSUSHIMA, 2007; NINOMIYA *et al.*, 2007; MATSUMOTO *et al.*, 2009). As características biomecânicas são consideradas o último indício das alterações do reparo ósseo, e são representadas pelos parâmetros de força do tecido reparativo (LUGER *et al.*, 1998).

Em relação às características biomecânicas avaliadas das regiões ósseas íntegras do osso osteotomizado, observou-se que a fluência de 60J/cm<sup>2</sup> e 120J/cm<sup>2</sup> não alteraram a energia de resistência do osso, mas a fluência de 60J/cm<sup>2</sup> de forma isolada promoveu um aumento da carga máxima apresentada pelas amostras em relação a todos os grupos exceto ao grupo CD. Este dado representa uma tendência do grupo L60 em apresentar uma melhora das propriedades biomecânicas das regiões ósseas íntegras.

Nos estudos de Luger *et al.* (1998) e Lirani-Galvão, Jorgetti e Silva (2006) encontrou-se melhora das propriedades biomecânicas dos grupos irradiados em relação ao grupo controle, quando foi realizado o teste de Flexão a Três Pontos, como único teste realizado. Esse teste tem como objetivo avaliar a resistência óssea por meio da somatória das características biomecânicas do calo ósseo e das regiões ósseas íntegras (LUGER *et al.*, 1998; LIRANI-GALVÃO; JORGETTI; SILVA, 2006). Caso este estudo tivesse realizado somente o teste de Flexão a Três Pontos como única análise biomecânica, poderia ter sido encontrada diferença significativa entre o grupo controle com defeito ósseo e o grupo que utilizou somente a terapia laser com fluência de 60J/cm<sup>2</sup>, pois seriam somadas as propriedades biomecânicas do calo ósseo e das regiões ósseas íntegras, totalizando uma diferença biomecânica que poderia ter sido detectada por meio do teste estatístico.

A terapia laser pode melhorar as características das regiões ósseas íntegras por meio da melhora do processo de reparo ósseo do calo ósseo que evitou a fragilização do osso íntegro, causada por uma possível reabsorção óssea (NORDIN; FRANKEL, 1989), ou por meio de uma estimulação das próprias células ósseas das regiões íntegras da tíbia que geram uma possível melhora do processo osteopênico geral do osso (RENNO *et al.*, 2006).

O estudo de Renno *et al.* (2006) encontrou melhora das características biomecânicas do osso osteopênico íntegro após a terapia laser, três vezes por semana durante 2 meses. A melhor resposta foi encontrada pelo grupo irradiado por 120J/cm<sup>2</sup>, resultado diferente ao encontrado neste estudo que apresentou a melhor resposta biomecânica das regiões ósseas integras, o grupo que utilizou a fluência de 60J/cm<sup>2</sup> de forma isolada. Esta diferença pode ser explicada pelo tempo de tratamento e pela diferença das características patológicas estudadas nos dois experimentos, o trabalho de Renno *et al.* (2006) foi realizado sem a presença de lesão óssea e neste trabalho, os ossos foram osteotomizados, lesão que pode modificar as condições gerais do metabolismo ósseo e das propriedades biomecânicas do osso (NORDIN; FRANKEL, 1989).

Há poucos artigos que relatam estudos que envolvam a associação do LLLT e a aplicação de biomateriais (KHADRA<sup>2</sup> *et al.*, 2004; KHADRA *et al.*, 2005; ABOELSAAD *et al.*, 2008). Alguns artigos baseiam-se na estimulação do processo de osteointegração de biomateriais metálicos pelo laser (CHO; JUNG, 2003; KHADRA<sup>2</sup> *et al.*, 2004; KHADRA *et al.*, 2005), e outros têm como objetivo avaliar a interação da terapia laser com a aplicação de biomateriais que se assemelham a tecidos orgânicos (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003; ABOELSAAD *et al.*, 2008).

Há vários tipos de biomateriais que se assemelham ao tecido ósseo, como o Gen-Tech<sup>®</sup> (CARVALHO *et al.*, 2006), Gen-ox<sup>®</sup> (PINHEIRO *et al.*, 2003) e os implantes de hidroxiapatita (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003). Estudos têm demonstrado que os biomateriais promovem uma lenta e gradual neoformação óssea (PINHEIRO *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2007) e que a associação com a LLLT promove uma maior estimulação do reparo ósseo por meio do aumento da angiogênese (CARVALHO *et al.*, 2006), das células ósseas (PINHEIRO *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2006), da deposição de fibras colágenas organizadas (PINHEIRO *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2006), das propriedades biomecânicas (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003) e da diminuição da intensidade das reações inflamatórias (CARVALHO *et al.*, 2006).

Neste estudo, a associação dos dois tratamentos, apresentou uma melhora das propriedades biomecânicas do calo ósseo em comparação ao grupo controle com defeito ósseo em relação às duas fluências utilizadas, 60J/cm<sup>2</sup> e 120J/cm<sup>2</sup>. O grupo tratado com 120J/cm<sup>2</sup> associado ao Biosilicato<sup>®</sup> apresentou os maiores valores, das propriedades biomecânicas analisadas, entre todos os grupos e inclusive os outros grupos tratados com o Biosilicato<sup>®</sup>. O grupo B+L60 não apresentou resposta em relação ao grupo B, logo pode se afirmar que a fluência de 120J/cm<sup>2</sup> foi à única capaz de promover acréscimo à resposta do

material bioativo aplicado de forma isolada em relação às propriedades biomecânicas do calo ósseo.

O estudo de Guzzardella, Torricelli e Giardino (2003) apresentou dados de melhora do processo de reparo ósseo por meio da terapia laser associada à aplicação de implantes de hidroxiapatita (HA) em osteotomias realizadas em fêmures de coelhos. Os autores encontraram resultados positivos em relação ao aumento do tecido ósseo na região da interface entre os implantes de HA e o tecido vivo. Esses dados são referentes ao processo de osteointegração dessa cerâmica bioativa estimulada pela terapia laser. Outro aspecto positivo, encontrado neste local avaliado, refere-se às propriedades biomecânicas, as quais apresentaram aumento da resistência do tecido irradiado oriundo de um processo de maturação do tecido ósseo estimulado pela terapia laser. Estes dados são semelhantes aos encontrados em nosso estudo, pois nos dois estudos houve aumento das propriedades biomecânicas do tecido ósseo associado à presença de biomateriais e da terapia laser.

Os dados do grupo que associou a terapia laser com o implante de HA demonstraram inicialmente uma elevação dos valores biomecânicos encontrados acima dos valores dos ossos normais, referentes à deposição do tecido, e depois apresentaram uma queda a valores considerados normais, relativos ao processo de remodelação. Os dados foram medidos por um teste de microdureza, com três e seis semanas de pós-operatório, que identificou os parâmetros relativos à resistência óssea (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003). Neste estudo, o grupo B+L120 somente apresentou dados superiores estatisticamente significativos aos valores dos ossos não osteotomizados na avaliação da carga máxima do Teste de Endentação com profundidade de 0-1,5mm e apresentou as outras características biomecânicas estudadas com valores iguais ou menores aos valores do grupo CP.

Os coelhos foram submetidos a cinco dias de terapia laser de GaAlAs (780nm), com os seguintes parâmetros: 300J/cm<sup>2</sup>, 1W, 300Hz, e tempo de aplicação de 10 minutos (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003). É extremamente complicado comparar a terapia laser do estudo acima com este estudo, devido às diferenças dos dois estudos em relação aos modelos vivos utilizados, ratos e coelhos, e as terapias utilizadas, tanto o biomaterial, Biosilicato<sup>®</sup> e implantes de HA, quanto à dosimetria da terapia laser.

O estudo de Pinheiro *et al.* (2003) analisou o processo de reparo ósseo de fêmures de ratos tratados com Gen-ox<sup>®</sup>, composto de osso bovino inorgânico (Gen-ox<sup>®</sup>; Baumer S/A, Mogi Mirim, SP, Brasil), isoladamente ou associado a LLLT. Foi encontrado ao redor das partículas do biomaterial formação de tecido ósseo, uma evidência da atividade

osteogênica do material bioativo. Contudo, foi observado que após o tempo necessário para o reparo ósseo, ainda havia a presença de biomaterial não absorvido nos animais dos grupos tratados, logo pode se considerar que o processo de reparo ósseo pode ter sido lentificado, devido a necessidade do material em ser absorvido. Além disso, foi encontrada uma maior reação inflamatória dos grupos tratados com o Gen-ox<sup>®</sup>, evidenciado pela observação de um grande número de macrófagos e células gigantes ao redor do material. O reparo ósseo do grupo que associou as duas terapias foi caracterizado por uma maior neoformação óssea, bem como, por uma maior proliferação de fibras de colágeno, a partir do 15º dia de pós-cirúrgico, em comparação ao grupo que foi tratado somente com o biomaterial.

O estudo de Carvalho *et al.* (2006) encontrou que a utilização do biomaterial Gen-Tech<sup>®</sup>, constituído de matriz orgânica óssea, osso bovino inorgânico, proteínas morfogenéticas (BMPs), hidroxiapatita e colágeno (Genius Baumer Biomaterial division S/A, código 9214.1,6, batch 012991), associado ao laser melhorou o processo de reparo ósseo identificado por um aumento do processo de angiogênese, das células osteoblásticas, das fibras de colágeno, e além disso, promoveu a diminuição das reações inflamatórias. O grupo que utilizou somente o biomaterial apresentou um extenso infiltrado inflamatório. Logo, pode-se concluir que a terapia laser promoveu uma melhora do processo inflamatório que pode ter sido intensificado pela presença do biomaterial.

Os estudos de Pinheiro *et al.* (2003) e Carvalho *et al.* (2006) comprovam que a associação da aplicação de biomateriais e da LLLT pode gerar a combinação das propriedades biomecânicas e osteogênicas dos biomateriais com a fotoestimulação do reparo ósseo por meio da terapia laser, além de diminuir possíveis efeitos colaterais, como a presença de uma maior reação inflamatória do tecido ósseo dos animais tratados com biomateriais. Esses efeitos combinados podem melhorar as propriedades biomecânicas do calo ósseo por apresentar uma melhora do processo de reparo ósseo (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003).

O estudo de Aboelsaad *et al.* (2008) avaliou a influência da terapia laser sobre o reparo de defeitos intra-ósseos periodontais tratados com um tipo de biovidro, o Perioglas<sup>®</sup> (Nova Bone Products, USA), em pacientes com periodontite crônica e defeitos ósseos bilaterais. Os resultados demonstraram uma diferença significativa entre o grupo irradiado e não irradiado em relação ao crescimento do tecido ósseo. O grupo irradiado apresentou maior crescimento do tecido ósseo do que o não irradiado. Não foi identificada a presença de complicações adversas da utilização do biomaterial e da terapia laser avaliadas por meio dos aspectos gerais do paciente e da região específica de tratamento. O crescimento do tecido

ósseo promove maior resistência do tecido ósseo às forças externas com conseqüente melhora das propriedades biomecânicas desse tecido (BARUSHKA; YAAKOBI; ORON, 1995; GARAVELLO-FREITAS *et al.*, 2003).

A terapia laser associada à aplicação de biomateriais, além de estimular o processo de reparo ósseo com conseqüente aumento das propriedades biomecânicas desse tecido (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.* 2006), também pode promover uma melhora do quadro clínico dos pacientes por meio da diminuição da dor e da presença de edemas (OZCELIK; HAYTAC; SEYDAOGLU, 2008).

As análises biomecânicas das regiões ósseas íntegras não encontraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos em relação à energia de absorção, mas o grupo B+L120 apresentou uma diminuição do parâmetro de carga máxima em comparação ao grupo CD. Esta diminuição pode ser explicada devido à elevada resistência demonstrada por esse grupo ao Teste de Endentação, fato que pode ter fragilizado as amostras para a realização do segundo teste, o Teste de Flexão a Três Pontos. Esta resposta não foi esperada, pois o sacrifício foi realizado com 14 dias e dados da literatura demonstram que nesse período as osteotomias apresentam-se em uma fase inicial de reparo ósseo com o início do surgimento de tecido ósseo organizado, mas ainda sem reestabeler a sua integridade óssea (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003; CARVALHO *et al.*, 2006) que gera valores biomecânicos mais baixos de resistência óssea no local da osteotomia (LUGER *et al.*, 1998).

A aplicação isolada do Biosilicato<sup>®</sup> aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo, mas a sua associação com a terapia laser gerou um aumento ainda maior das propriedades biomecânicas o que pode ter fragilizado o osso no momento do teste de Endentação, apesar do teste de Endentação ser conhecido por gerar poucos danos ao material analisado e poder ser aplicado antes de outros testes biomecânicos (NORDIN; FRANKEL, 1989).

O teste de Flexão a Três Pontos quando aplicado após o Teste de Endentação, com a tibia posicionada com o defeito ósseo para baixo, apresenta como a maior estrutura de resistência ao teste a cortical contralateral ao defeito ósseo. A penetração máxima que foi realizada pelo Teste de Endentação foi de 1,5mm, que corresponde a menos da metade da profundidade média apresentada pelas tíbias (Apêndice B), logo essa perfuração não gera prejuízos a cortical contralateral que é responsável por promover a maior resistência ao Teste de Flexão a Três Pontos, mas como os valores do teste de Endentação do grupo B+L120

foram muito elevados, mesmo assim, pode ter ocorrido uma fragilização da estrutura desses ossos.

A aplicação do laser de forma isolada não encontrou resultados significativos de melhora das propriedades biomecânicas do osso osteotomizado, avaliado pela junção do teste de Endentação e de Flexão a Três Pontos, em comparação ao grupo controle, mas pode-se verificar uma tendência do grupo tratado com  $60\text{J}/\text{cm}^2$  a apresentar uma melhor resposta biomecânica. Resposta diferente ao encontrado em relação à associação dos dois tratamentos que encontrou que o grupo tratado com laser com fluência de  $120\text{J}/\text{cm}^2$  apresentou a melhor resposta biomecânica entre todos os grupos tratados, por apresentar elevadas propriedades biomecânicas da região do calo ósseo, que após a osteotomia é a região mais frágil do osso por não ter restabelecido a sua integridade óssea (GUZZARDELLA; TORRICELLI; GIARDINO, 2003).

A aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> altera as características do defeito ósseo, pela presença do próprio biomaterial e do HCA originado pelo Biosilicato<sup>®</sup>. Nos grupos tratados somente com a terapia laser, a energia eletromagnética interagiu primeiramente com um calo fibroso constituído por um tecido conjuntivo rico em células osteogênicas, providas da intensa proliferação do periósteo e do endósteo (HOLLINGER; WONG, 1996) e depois por um calo ósseo formado por tecido imaturo, que se formou de modo desordenado, caracterizado pelo arranjo irregular dos osteoblastos e orientação irregular das fibras colágenas (HOLLINGER; WONG, 1996; TROWBRIDGE; EMLING, 1996). Os grupos que associaram os dois tratamentos, a energia eletromagnética interagiu com uma cavidade preenchida com o biomaterial que apresenta características diferentes do calo fibroso e do calo ósseo imaturo dos grupos os quais não foram tratados com o material bioativo. Essas alterações das características locais do calo ósseo influenciaram a interação biológica do laser devido às características físicas dos raios laser, logo pode se verificar que nos grupos tratados somente com a terapia laser, a fluência de  $60\text{J}/\text{cm}$  pode ter sido eficaz para o tratamento e nos grupos tratados com o material bioativo foi necessário uma maior fluência do laser,  $120/\text{cm}^2$ , para que houvesse resposta do tratamento. Essa maior energia aplicada aos tecidos pode ter sido necessária devido às características físicas do material bioativo e da HCA em sua interação óptica com os raios laser.

Além das vantagens da terapia laser associada à aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> sobre o processo de reparo ósseo, essa forma de tratamento, também, pode ser benéfica sobre o processo de osteointegração de biomateriais metálicos ao osso, devido ao Biosilicato<sup>®</sup> apresentar características osteogênicas e biomecânicas (MOURA *et al.*, 2007; JABUR, 2008)

e a LLLT poder estimular o tecido ósseo e intensificar os eventos celulares responsáveis pela osteointegração (KHADRA *et al.*, 2005).

### 3.2- CONCLUSÃO GERAL

A aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> aumentou as propriedades biomecânicas do calo ósseo e não alterou as propriedades das regiões ósseas íntegras do osso osteotomizado. A terapia laser não promoveu diferença significativa das propriedades biomecânicas do calo ósseo e das regiões ósseas íntegras do osso e a associação dos dois tratamentos com fluência de 120J/cm<sup>2</sup> promoveu um aumento das propriedades biomecânicas do calo ósseo a valores mais elevados do que o grupo que utilizou somente o biomaterial.

### 3.3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou os efeitos do laser de baixa intensidade e de um biomaterial, o Biosilicato<sup>®</sup>, utilizados independentemente ou associados sobre as propriedades biomecânicas de tíbias osteotomizadas em ratas osteopênicas, mas inúmeras questões necessárias a uma correta e segura aplicação dos tratamentos propostos ainda precisam ser analisadas. Podem-se enumerar algumas informações necessárias a serem pesquisadas em estudos posteriores:

- Definição dos mecanismos estimulatórios da LLLT sobre as células ósseas e o tecido ósseo, com o intuito de se encontrar os melhores parâmetros e indicações da terapia laser.
- Realização de estudos longitudinais do tratamento laser para verificar a sua influência sobre o tecido após o período de tratamento.
- Definição dos mecanismos de ação do Biosilicato<sup>®</sup> em vivo e *in vitro* com observações longitudinais em diversos tipos de tecido.

- Definição dos mecanismos envolvidos em relação ao processo de reparo ósseo envolvidos sobre a interação da aplicação do Biosilicato<sup>®</sup> com a terapia laser.
- Quantificação da influência do processo de osteopênia e osteoporose sobre o processo de reparo ósseo e sua associação com a aplicação de biomateriais e a LLLT.
- Realização de estudos da associação do Biosilicato<sup>®</sup> e da LLLT para melhorar o processo de osteointegração de biomateriais metálicos.

### 3.4- REFERÊNCIAS

ABOELSAAD, N. S.; SOORY, M.; GADALLA, L. M. A.; RAGAB, L. I.; DUNNE, S.; ZALATA, K. R.; LOUCA, C. Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study). **Lasers Med Sci**, 2008. Visitado em: <http://www.springerlink.com/content/p1571n24575|1310>. Acesso em 28 de fevereiro de 2009.

AUBIN, J. E.; LIU, F. The osteoblast lineage In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, J.G., RODAN, G.A. (eds). **Principles of bone biology**, Academic Press, San Diego, 1996, p. 51-67.

BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of Low-Energy Laser (He-Ne) Irradiation on the Process of Bone Repair in Rat Tibia. **Bone**, v. 16, n.1, p. 47-55, 1995.

BRANDI, M. L.; HUKKANEM, M.; UMEDA, T.; MORADI-BIDHENDI, N.; BIANCHI, S.; GROSS, S. S.; POLAKI, J. M.; MACINTYRE, I. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 2954-2958, 1995.

BENAQQA, C.; CHEVALIER, J.; SAËDAOUI, M.; FANTOZZI, G. Slow crack growth behaviour of hydroxyapatite ceramics. **Biomaterials**, v. 26, p. 6106-6112, 2005.

CARVALHO, P. T. C.; SILVA I. S.; REIS F. A.; BELCHIOR, A. C. G.; FACCO, G. G.; GUIMARÃES, R. N.; FERNANDES, G. H. C.; DENADAI, A. S. Effect of 650nm low-power laser on bone morphogenetic protein in bone defects induced in rat femors. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. supl. 4, p. 63-68, 2006.

CHO, S. A.; JUNG, S. K. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. **Biomaterials**, v. 24, p. 4859-4863, 2003.

COMELEKOGLU, U.; BAGIS, S.; YALIN, S.; OGENLER, O.; YILDIZ, A.; SAHIN, O.; OGUZ, I.; HATUNGIL, R. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. **Clin Rheumatol**, v. 26, p. 380-4, 2007.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHOMOLL, H. J. Cyclo-oxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **J Cancer Res Clin Onco**, v. 127, p. 411-417, 2001.

DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin Oral Impl Res**, v. 11, p. 540-545, 2000.

FREITAS, I. G. F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Laser effects on osteogenesis. **Appl Surf Sci**, v. 154-155, p. 548-554, 2000.

GARNERO, P.; BOREL, O.; GINEYTS, E.; DUBOEUF, F.; SOLBERG, H.; BOUXSEIN, M. L.; CHRISTIANSEN, C.; DELMAS, P. D. Extracellular post-translational modifications of collagen are major determinants of biomechanical properties of fetal bovine cortical bone. **Bone**, v. 38, p. 300-3009, 2006.

GARAVELLO-FREITAS; BARANAUSKAS, V.; JOAZEIRO P. P.; PADOVANI, C. R.; DAL PAI-SILVA, M.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Low-power laser irradiation improves histomorfometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J Photochem Photobiol B**, v. 70, p. 81-89, 2003.

GUZZARDELLA, G. A.; FINI, M.; TORICELLI, P.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Laser Stimulation on Bone Defect Healing: In Vitro Study. **Lasers Med Sci**, v. 17, p. 216-220, 2002.

GUZZARDELLA, G. A.; TORRICELLI, P.; GIARDINO, N. N. A. R. Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. **Clin Oral Impl Res**, v. 14, p. 226-232, 2003.

HAMAJIMA, S.; HIRATSUKA K.; KIYAMA-KISHIKAWA, M.; TAGAWA, T.; KAWAHARA, M.; OHTA, M.; SASAHARA, H.; ABIKO, Y. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. **Lasers Med Sci**, v. 18, p. 78-82, 2003.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, v. 295, p. 1016-1017, 2002.

HOCKING, A. M.; SHINOMURA, T.; McQUILLAN, D.J. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. **Matrix Biol**, v. 17, p. 1-9, 1998.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. K. The integrated processes of hard tissue regeneration with especial emphasis on fracture healing. **Oral Surg Med Oral Pathol**, v. 82, n. 6, p. 594-606, 1996.

JABUR, R. O. **Avaliação clínica, histológica e histomorfométrica do reparo de defeitos ósseos criados em mandíbula de cães preenchidos com Biovidro<sup>®</sup> 45S5 ou biosilicato<sup>®</sup> após a colocação de implantes osseointegráveis.** Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. 88 p.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of Low-Energy Laser Irradiation on Bone Remodeling During Experimental Tooth Movement in Rats. **Lasers Surg Med**, v. 26, p. 282-291, 2000.

KHADRA<sup>1</sup>, M.; KASEM, N.; HAANAES, H. R.; ELLINGSEN, J. E.; LYGSTADAAS, P. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg Med Oral Pathol**, v. 97, n. 6, p. 693-699, 2004.

KHADRA<sup>2</sup>, M.; RONOLD, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; ELLINGSEN, J. E.; HAANAES, H. R. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin Oral Impl Res**, v. 15, p. 325-332, 2004.

KHADRA, M.; LYGSTADAAS, S. P.; HAANAES, H. R.; MUSTAFA, K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. **Biomaterials**, v. 26, p. 3503-3509, 2005.

KOTHA, S. P.; GUZELSU, N. Tensile behavior of cortical bone: Dependence of organic matrix material properties on bone mineral content. **J Biomech**, v. 40, p. 36-45, 2007.

LIRANI-GALVÃO, A. P.; JORGETTI, V.; SILVA, O. L. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 6, p. 735-40, 2006.

LIU, F.; MALAVAL, L.; GUPTA, A. K.; AUBIN, J. E. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. **Exp Cell Res**, v. 232 p. 97-105, 1997.

LUGER, E. J.; ROCHKIND, S.; WOLLMAN, Y.; KOGAN, G.; DEKEL, S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg Med**, v. 22, p. 97-102, 1998.

MALAVALL, L.; LIU, F.; ROCHE, P.; AUBIN, J. E. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. **J Cell Res**, v. 232 p. 97-105, 1999.

MATSUI, S.; TSUJIMOTO, Y.; MATSUSHIMA, K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 1, p. 27-31, 2007.

MATSUMOTO, M.A; FERINO, R.V.; MONTELEONE, G.F.; RIBEIRO, D.A. Low-level laser therapy modulates cyclo-oxygenase-2 expression during bone repair in rats. **Lasers Med Sci**, v.24, n. 2, p. 195-201, 2009.

MOURA, J.; TEXEIRA, L. N.; RAVAGNANI, C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D.; BELOTI, M. M.; PANZERI, H.; ROSA, A. L.; OLIVEIRA, P. T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). **J Biomed Mater Res A**, v. 82 p. 547-557, 2007.

NICOLAU, R.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M. T. T.; REIS, L. M. ZÂNGARO, R. A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**, v. 18, p. 89-94, 2003.

NINOMIYA, T.; HOSOYA, A.; NAKAMURA, H.; SANO, K.; NISHISAKA, T.; OZAWA, H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. **Bone**, v. 40, p. 140-148, 2007.

NORDIN, M.; FRANKEL, V. H., Biomechanics of bone, In: NORDIN, M.; FRANKEL, V. H. **Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System**. 2.ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 1989, p. 3-31.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. **Bone**, v. 22, p. 347-354, 1998.

OZCELIK, O.; HAYTAC, M. C.; SEYDAOGLU, G. Enamel matrix derivate and low-level laser therapy in the treatment of intra-bony defects: a randomized placebo-controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 147-156, 2008.

PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G.; MARTINS, P. P.; RAMALHO, L. M. P.; OLIVEIRA, M. A. M.; NOVAES JUNIOR, A.; NICOLAU, R. A. Biomodulatory effects of LLLT on bone regeneration. **Laser Ther**, v. 13, Special Millenium Edition, p. 73-79, 2001.

PINHEIRO A. L.; LIMEIRA JÚNIOR F. A.; GERBI M. E.; RAMALHO L. M.; MARZOLA C.; PONZI E. A.; SOARES A. O.; CARVALHO L. C.; LIMA H. C.; GONÇALVES T. O. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J Clin Laser Med Surg**, v. 21, p. 383–388, 2003.

RALSTON, S. H.; TODD, D.; HELFRICH, M. et al., Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible oxide synthase. **Endocrinology**, v. 135, p. 330-336, 1994.

RENNO, A. C. M.; MOURA, F. M.; SANTOS, N. S. A. S.; TIRICO, R. P.; BOSSINI, P. S.; PARIZOTTO, N. A. Effects of 830-nm Laser, Used in two Doses, on Biomechanical Properties of Osteopenic Rat Femora. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 2, p. 202-206, 2006.

RORIZ, V. M. **Avaliação clínica, histológica de alvéolos dentários de cães preenchidos com biovidro ou Biosilicato<sup>®</sup>, que posteriormente receberam implantes osseointegráveis.** Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006. 105 p.

SATO, Y.; ARAI, N.; NEGISHI, A.; OHYA, K. Expression of cyclooxygenase genes and involvement of endogenous prostaglandin during osteogenesis in the rat tibial bonemarrow cavity. **J Med Dent Sci**, v. 44 p. 81-92, 1997.

SILVA JÚNIOR, A. N.; PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G.; WEISMANN, R.; RAMALHO, L. M. P.; NICOLAU, R. A. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg**, v. 20, n. 2, p. 83-87, 2002.

STEIN A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg**, v. 23, p. 161-166, 2005.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. Regeneração e cicatrização. In: **Inflamação: uma revisão do processo**. 4 ed. São Paulo: Quintessence, cap. 7, p. 146-147, 1996.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJI, S. SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v. 93, p. 705-716, 1998.

XYNOS, I. D.; EDGAR, A. J.; BUTTERY, L. D. K.; HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. **J Biomed Mater Res**, v. 55, p. 151-157, 2001.

YAMAMOTO, M.; TAMURA, K.; HIRATSUKA, K.; ABIKO, Y. Stimulation of MCM<sub>3</sub> gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. **Laser Med Sci**, v. 16, n. 3, p. 213-217, 2001.

YAMAMOTO, M.; KAWAHARA, M.; ABIKO, Y. Enhanced gene expression by low-level laser irradiation. Identification of annexin III gene by subtractive gene cloning. **Nippon Koku Inpuranto Gakkaishi**, v. 15, n. 3, p. 323-329, 2002.

ZHANG, X.; SCHWARZ, E. M.; YOUNG, D. A.; PUZAS, E.; ROSIER, R. N.; O'KEEFE, R. J. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cells differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. **J Clin Invest**, v. 109, p. 1405-1415, 2002.





ARTIGO CIENTÍFICO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA: JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY

**Biosilicate<sup>®</sup> and the Low Level Laser Therapy increases the mechanical properties of tibial bone callus in osteopenic rats**

**Renan Fangel<sup>1</sup>, Paulo Sérgio Bossini<sup>2</sup>, Ana Cláudia Renno<sup>3</sup>, Charles Chenwei Wang<sup>4</sup>, Keico Okino Nonaka<sup>5</sup>, Patrícia Driusso<sup>6</sup>, Nivaldo Antonio Parizotto<sup>7</sup>, Jorge Oishi<sup>8</sup>**

<sup>1</sup> Master degree student, Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos. Federal University of São Carlos. Rod. Washington Luiz, km 235, Sao Carlos, SP, 13565-2081, Brazil. Phone: (55-16) 33517527, Fax: (55-16) 33517527. Email: renanfangel@yahoo.com.br

<sup>2</sup> PhD student, Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos. Rod. Washington Luiz, km 235, Sao Carlos, SP, 13565-2081, Brazil. Phone: (55-16) 33518985, Fax: (55-16) 33518985. Email: paulobossini@ig.com.br.

<sup>3</sup> Professor, Department of Bioscience, Federal University of Sao Paulo, Av. Ana Costa, 95, Santos, SP. Phone: (55-13) 32218058. Fax: (55-16) 33518985. Email: a.renno@unifesp.br

<sup>4</sup> PhD student, Department of Biology, Federal University of São Carlos. Rod. Washington Luiz, km 235, Sao Carlos, SP, 13565-2081, Brazil. Phone: (55-16) 3351-8454, Fax: (55-16) 3351-8327. Email: charles@ufscar.br

<sup>5</sup> Professor, Department of Biology, Federal University of São Carlos. Rod. Washington Luiz, km 235, Sao Carlos, SP, 13565-2081, Brazil. Phone: (55-16) 3351-8454, Fax: (55-16) 3351-8327. Email: keico@power.ufscar.br

<sup>6</sup> Professor, Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos. Rod. Washinton Luiz, km 235, Sao Carlos, SP, 13565-2081, Brazil. Phone: (55-16) 33517527, Fax: (55-16) 33517527 Email: pdriusso@ufscar.br

<sup>7</sup> Professor, Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos. Rod. Washington Luiz, km 235, Sao Carlos, SP, 13565-2081, Brazil. Phone: (55-16)33518630, Fax: (55-16) 33518985. Email: parizoto@ufscar.br

<sup>8</sup> Professor, Department of Statistic, Federal University of São Carlos. Rod. Washington Luiz, km 235, Sao Carlos, SP, 13565-2081, Brazil. Phone: (55-16) 33517527, Fax: (55-16) 33517527. Email: djo@ufscar.br

## Abstract

**Background and objective:** The aim of this study was to determine the effects of the Biosilicate<sup>®</sup> and the lasertherapy on bone consolidation of osteopenic rat. **Materials and methods:** Seventy female Wistar rats (12 weeks-old,  $\pm$  250g) ovariectomy was carried on. The animals were randomly divided into 7 groups, with 10 animals each: osteopenic standard control (SC); osteopenic fractured control (OC), bone defect treated with Biosilicate<sup>®</sup> (B), bone defect treated with laser 60J/cm<sup>2</sup> (L60), bone defect treated with laser 120J/cm<sup>2</sup> (L120), bone defect treated with both treatments Biosilicate<sup>®</sup> and laser 60J/cm<sup>2</sup> (B+L60), bone defect treated with both treatments Biosilicate<sup>®</sup> and laser 120J/cm<sup>2</sup> (B+L120). Sixty days post-OVX, the osteotomies were surgically performed on the left tibia. In the Biosilicate<sup>®</sup> treated animals, the cavities were carefully filled with the biomaterial. An 830nm laser was performed for 7 sessions. On day 14 post-osteotomy, rats were sacrificed and the tibias were defleshed. Biomechanical properties of the tibia were determined by the Indentation's Test. From de load-deformation curve, the maximal load (KN) and energy absorption (J) were obtained. Statistical analysis were performed using Kruskal-Wallis Test and Mann-Whitney U Test, with the level of significance of 5% ( $p \leq 0.05$ ) **Results:** The groups SC, B, B+L60 and B+L120 presents higher statistically values ( $p \leq 0.05$ ) in relation to group OC and the group B+L120 showed statistically higher results ( $p \leq 0.05$ ) in relation to groups OC, B, L60, L120 and B+L60. **Conclusion:** The Indentation's Test results demonstrate that the Biosilicate<sup>®</sup> application raised the biomechanical properties of the callus bone. The groups with treatment based only on laser irradiation haven't presented significant results in relation to group control fracture. The better biomechanical answer among the groups was present by the group with Biosilicate<sup>®</sup> utilization in association of 120J/cm<sup>2</sup>.

**Keywords:** osteoporosis, fracture healing, biomaterial, low level lasertherapy, biomechanical properties.

Pages Title: **Biosilicate<sup>®</sup> and the LLLT increases the mechanical properties of bone callus.**

### Abbreviations:

LLLT - low level laser therapy

OVX – ovariectomy

GaAlAs – gallim-aluminium-arsenide

## 1. Introduction

Osteoporosis is a clinical syndrome in which bone mass is lower than expected for individuals of a given age and race, resulting in bone weakness and increase of susceptibility to fractures [1]. Osteoporosis represents a severe health threat to elderly people and it has recently been recognised as a major public health problem [2]. It is related with some clinic manifestations, mainly the increase of the fractures risk [2,3]. The most frequent fractures occur in the distal forearm, vertebrae, ribs, humerus and hip [1].

Hip fractures are considered the cause of severe disability, loss of independence and substantially affect the patient's quality of life [4]. Vertebral fractures are the most frequent osteoporotic fractures and frequently result in alterations in the physiological spinal curvatures, such as scoliosis, kyphoscoliosis and accentuated increase in the degree of thoracic kyphosis [5].

In this context, there is a critical need to develop technologies able of treating osteoporotic fractures [6]. One promising treatment is the use of bioglasses and polymers, which seem to induce osteogenesis and stimulate fracture healing [7,8].

A wide variety of biodegradable polymers, bioactive glasses and ceramics-glass have been used as a graft to be used in the healing of large bone defects [9]. One of the most common and studied bioactive glass is the Bioglass<sup>®</sup> 45S5, which has been know as the bioactive glass with the highest bioactivity index [7]. Recently, our research group has developed a novel fully-crystallized bioactive glass-ceramic of the quaternary P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> system (Biosilicate<sup>®</sup>, patent application WO 2004/074199). The Biosilicate<sup>®</sup> has showed a stimulatory effect on bone cell metabolism [10]. Comparing the growth of osteogenic cells on Biosilicate<sup>®</sup> and Bioglass<sup>®</sup> 45S5 disks for a period of up to 17 days, Moura et al. [10] found that, although no significant differences were detected in terms of protein content and alkaline phosphatase activity at days 11 and 17, Biosilicate<sup>®</sup> supported significantly larger areas of calcified matrix at day 17. The results indicate that full crystallization of bioactive glasses in a range of compositions of the system P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> may promote enhancement of *in vitro* bone-like tissue formation in an osteogenic cell culture system [10].

Similarly, a significant body of evidence has now accumulated demonstrating that Low Level Laser Therapy (LLLT) also has a positive effect on bone tissue metabolism

and fracture consolidation [11,12,13]. Trelles and Mayayo [14] found that HeNe laser irradiation (4mW, 2.4J/cm<sup>2</sup>, 12 sessions) in mice tibial fractures promoted an increase in vascularization and an acceleration of bone tissue consolidation compared to the control group. Pinheiro et al. [15] showed that the 830nm laser (830nm, 10mW, 4.8J/cm<sup>2</sup>) was capable of increasing the amount of mineralized bone tissue on femoral induced fractures in rats. Also, the laser seems to be able of stimulating the metabolism of bone tissue in osteoporotic rats [11]. However, no studies were found investigating the effects of the lasertherapy on bone fractures in osteoporotic rats.

Although the positive effects of Biosilicate<sup>®</sup> and the LLLT on bone cell proliferation, their effects on osteoporotic fracture consolidation were not studied yet. Before both therapies can be used with confidence as a therapeutic modality in fractures, it is necessary to investigate the effects and dose-response characteristics of these treatments in studies in vivo to determine its safety and efficacy. In this context, this study had the aim of investigate the effects of Biosilicate<sup>®</sup> and lasertherapy on biomechanical properties of tibial bone callus in osteoporotic rats.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Study design

This study was conducted in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Sao Carlos (n° 025/2006). The animals were maintained at 19-23°C on a 12:12-h light-dark cycle in the Animal Experimentation Laboratory of the Federal University of Sao Carlos. They were housed in plastic cages and had free access to water and standard food.

Seventy female Wistar rats (12 weeks-old, ± 250g) ovariectomy was carried on. The animals were randomly divided into 7 groups, with 10 animals each: **group 1:** osteopenic standard control (SC); **group 2:** osteopenic fractured control (OC); **group 3:** bone defect treated with Biosilicate<sup>®</sup> (B); **group 4:** bone defect treated with laser 60J/cm<sup>2</sup> (L60); **group 5:** bone defect treated with laser 120J/cm<sup>2</sup> (L120); **group 6:** bone defect treated with

both treatments Biosilicate<sup>®</sup> and laser 60J/cm<sup>2</sup> (B+L60); **group 7:** bone defect treated with both treatments Biosilicate<sup>®</sup> and laser 120J/cm<sup>2</sup> (B+L120).

## 2.2 Surgical Procedure of Ovariectomy

Ovariectomy (OVX) was performed via bilateral translumbar incisions, under Ketamine/ Xilazine anesthesia (80/10 mg/Kg). The uterine tubes were ligated and after removal of the ovaries, the incisions were closed. After the surgery, all animals were conditioned during 8 weeks with the purpose of inducing osteopenia [16].

## 2.3 Surgical Procedure of Osteotomy

Eight weeks post-OVX surgery, the osteotomies were surgically performed on the right tibia. The procedures were done after under Ketamine/ Xilazine anesthesia (80/10 mg/Kg). The mid-regions of the tibial were shaved and disinfected with povidone iodine. A dermo-periosteal incision was performed to expose the tibia. A 2,0mm of diameter cavity defect was made, using a spherical bur under copious irrigation with saline solution. In the Biosilicate<sup>®</sup> treated animals; the cavities were carefully filled with the corresponding biomaterial. The cutaneous flap was replaced and sutured with resorbable polyglactin, and the skin was disinfected with povidone iodine. The health status of the rats was monitored daily.

## 2.4 LLLT

A low-energy GaAlAs (Teralaser, DMC<sup>®</sup> São Carlos, SP, Brazil), 830nm, CW, 0.028cm<sup>2</sup> beam, 100mW, 60J/cm<sup>2</sup> (1.7J) and 120J/cm<sup>2</sup> (3.4J) with a irradiation time of 17s and 34s was used in this study. Laser irradiation was initiated immediately after the osteotomy procedure and it was performed, on days 2, 4, 6, 8, 10 and 12 post-surgery. On day 14 post-osteotomy, rats were sacrificed.

## 2.5 Biomechanical test

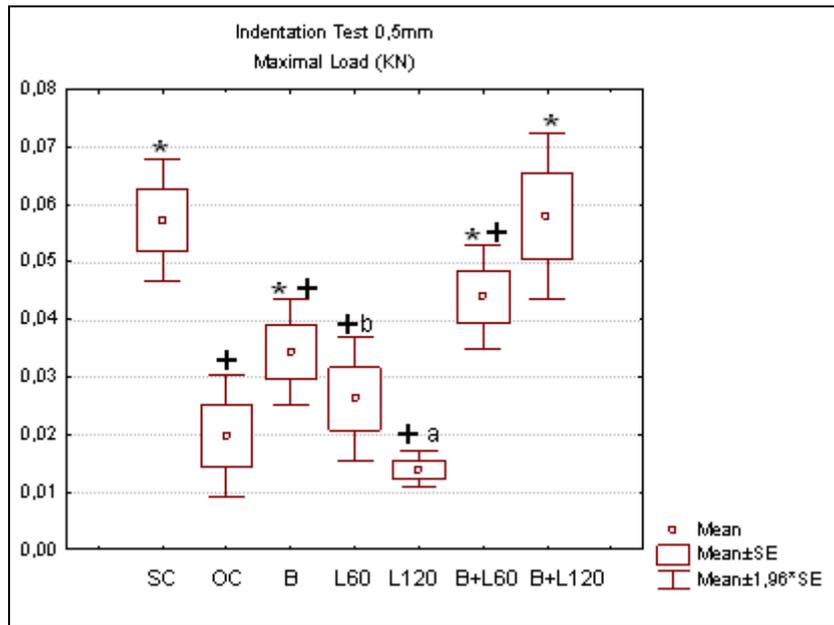
Biomechanical properties of the right tibia were determined by tests in a Instron Universal Testing Machine (Instron cop, Cantn, MA, 4444 model). Before the test, bones were thawed at room temperature. To perform the indentation test, an indenter was used to test the mechanical properties of the bone callus. A cylindrical indenter of 2.0mm diameter was applied to the center of the bone callus on the face of the tibia at a constant displacement velocity of 1mm/min. A 1-N pre-load was applied in order to avoid specimen sliding. A special device was used to locate the tibias, prior to submitting their medial surface (repair area) to penetration. The indenter was allowed to penetrate the cavity to a depth of 1.5mm. From the load-penetration curve, the maximal load (KN) and energy absorption (J) were obtained to a depth of 0-0.5mm and 0-1.0mm.

## 2.6 Statistical analysis

The results are given in mean and standard error. The Kruskal-Wallis test was used to compare changes among the groups and the Mann-Whitney U test to identify the differences. A p level of  $\leq 0.05$  was considered as being statically significant.

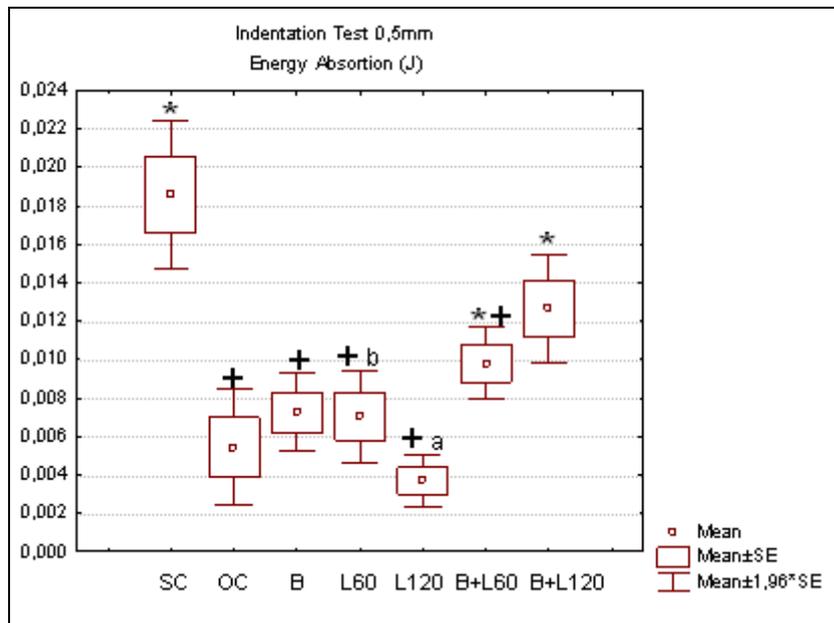
## 3. Results

Figure 1 represents the media, standard error and the confidence interval ( $\pm 1,96 \cdot \text{EPM}$ ) of each group in relation to maximal load of the indentation's test at 0.5mm depth. The groups SC, B, B+L60 and B+L120 presents higher statistically values ( $p \leq 0.05$ ) in relation to group OC. The indentation's test maximal load from group B+L120 showed statistically higher results ( $p \leq 0.05$ ) in relation to groups OC, B, L60, L120 and B+L60. The group L60 was statistically better than group L120. The group B+L60 presents statistically significant higher values in relation to group L60.



**Figure 1.** Change in the maximal load of the Indentation Test 0.5mm depth  $p \leq 0.05$ , \* vs group 2, + vs group 7, a vs group 4, b vs group 6

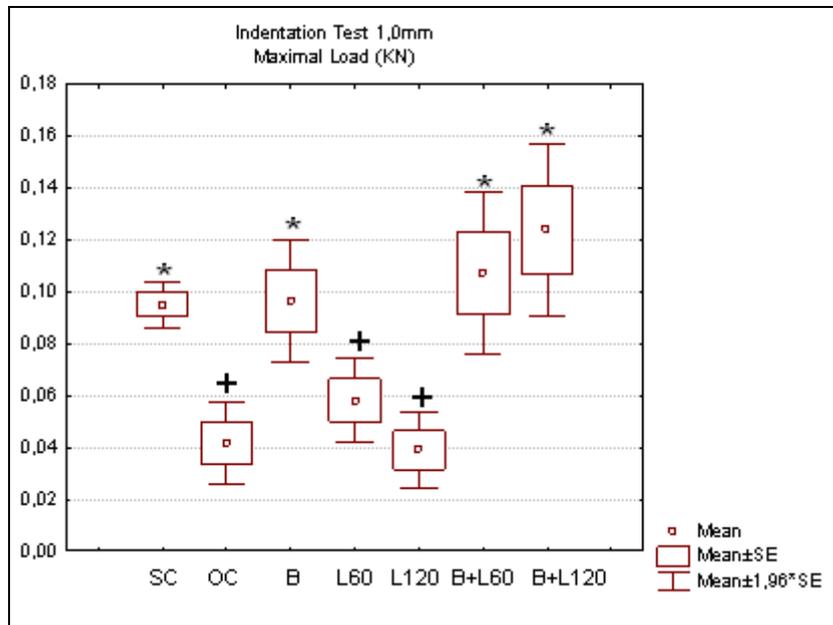
Figure 2 refers to energy's indentation at 0.5mm depth data from indentation's test. Watching the results they're similar to that ones found at maximal load review from de same test. The only difference was no statistically difference at group B in relation to groups OC.



**Figure 2.** Change in the energy's absorption from Indentation Test 0.5 mm  $p \leq 0.05$ , \* vs group 2, + vs group 7, a vs group 4, b vs group 6

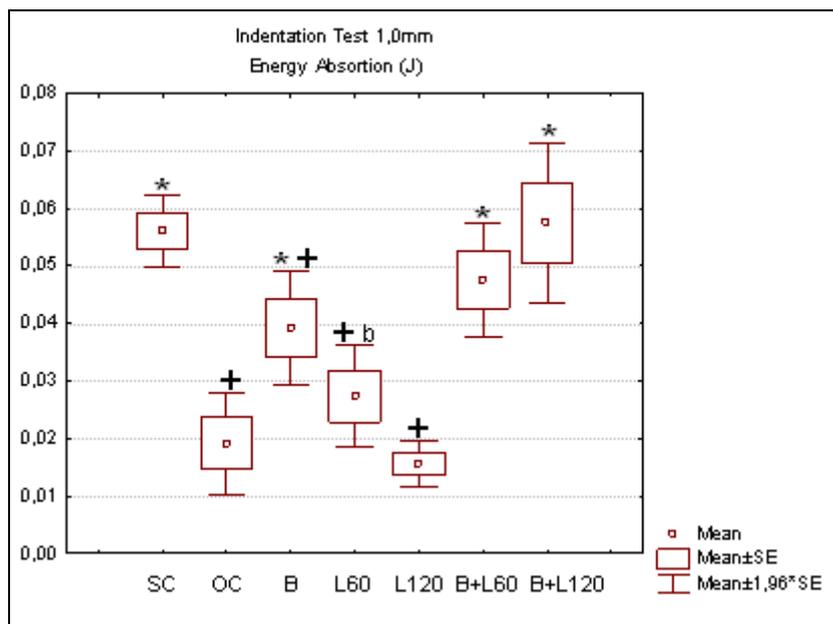
Figure 3 demonstrates the media, standard error and the confidence interval ( $\pm 1,96 \cdot EPM$ ) of each group in relation to maximal load from indentation's test at 1.0mm depth.

The groups SC, B, B+L60 and B+L120 presents higher statistically values ( $p \leq 0.05$ ) in relation to group OC. The maximal load from group's B+L120 indentation's test presented higher statistically results in relation to groups OC, L60 and L120.



**Figure 3.** Change in the energy's absorption from Indentation Test 1.0 mm  $p \leq 0.05$ , \* vs group 2, + vs group 7

Figure 4 refers to energy's absorption data's or resistance of indentation's test at 1.0mm depth. Watching the results they're similar to that ones found at maximal load review from de same test. The difference was significant difference of group B+L120 in relation to group B and between groups B+L60 and L60.



**Figure 4.** Change in the energy's absorption from Indentation Test 1.0mm  $p \leq 0.05$ , \* vs group 2, + vs group 7, b vs group 6

#### 4. Discussion

The Indentation's Test results demonstrate that the Biosilicate<sup>®</sup> application raised the biomechanical properties of the callus bone. The groups with treatment based only on laser irradiation haven't presented significant results in relation to group control fracture. On the other hand the laser's irradiation group 60J/cm<sup>2</sup> presented a significant better answer in relation to group laser's irradiation 120J/cm<sup>2</sup> at 0.5mm depth. The better biomechanical answer among the groups was present by the group with Biosilicate<sup>®</sup> utilization in association of 120J/cm<sup>2</sup>.

Many authors have demonstrated that biodegradable polymers and bioactive glasses have osteogenic properties and can be used as a graft to heal large bone defects [9], mainly to their facility to adapt to the defects shape, their potential to stimulate osteogenesis and their capability to influence bone bonding [17]. However, the success of the biomaterial implant and the improvement of the fracture consolidation are dependent on many characteristics of the material as the composition, solubility and particle size [18, 19].

In an in vitro study, it was demonstrated that osteogenic effects of the Biosilicate<sup>®</sup> [10]. The Biosilicate<sup>®</sup> is a novel fully-crystallized bioactive glass-ceramic of the quaternary P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> system [20]. Moura et al. [10] showed that there was an enhanced production of bone-like matrix by osteogenic cells grown on Biosilicate<sup>®</sup>. The authors suggested that it could result from the selective recruitment of progenitor cells from the mixed cell population obtained following enzymatic digestion of calvarial bone and the stimulation of osteoblast activity by ionic products distinctively released from Biosilicate<sup>®</sup> [10].

Many studies have showed that the LLLT is able to increase bone cell proliferation and to stimulate bone metabolism [21]. The action of laser therapy is based on the absorption of the light by tissues, which will generate a series of modifications in cell metabolism. When laser is applied to tissue, the light is absorbed by chromophore photoreceptors located in the cells. Once absorbed, the light can modulate cell biochemical reactions and stimulate mitochondrial respiration, with the production of molecular oxygen and ATP synthesis. These effects are known to increase the synthesis of DNA, RNA and cell-cycle regulatory proteins, therefore promoting cell proliferation and accelerating fracture consolidation [14,21]. In this study, it is possible that the 830nm laser irradiation may have

stimulated osteoblast cells differentiation, stimulating and accelerating their transformation on mature cells and promoting the increase of bone formation.

We consider the methodology used in this work very appropriated. The ovariectomy is a reliable and widely used experimental model to induce osteopenia in rats, conducting to a decrease of bone mass and an increase of bone fragility [16,22]. Moreover, the indentation test was used to measure the effects of both treatments on the mechanical strength of the tibial callus. This test has been widely used in works measuring the effects of treatments in a series of bone disorders, including the effects of LLLT on fracture bone consolidation [23,24,25].

## References

- [1] E.G. Culhan, H.I. Jimenez, C.B.K. King. Thoracic kyphosis, rib mobility, and lung volumes in normal women and women with osteoporosis. *Spine*. 19 (1994) 1250-1255.
- [2] R.F. Klein, S.R. Mitchel, T.J. Phillipis, J.K. Belknap, E.S. Orwoll. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. *J. Bone Miner. Res.* 13 (1998) 1648-1656.
- [3] M. Sinaki, P.C. Wollan, R.W. Scott. Gelczer, R.K. Can strong extensor prevent vertebral fractures in women with osteoporosis? *Mayo Clinic. Proc.* 71 (1996) 951-956.
- [4] M.L. Bianchi, M.R. Orsini, S. Saraifoger, S. Ortolani, G. Radaelli, S. Betti. Quality of live in post-menopausal osteoporosis. *Health and Quatily of Life Outcomes* 2005; 3:78. Available from: <http://www.hqo.com/content/3//78>.
- [5] A.A. De Smet, R.G. Robinson, B.E. Johnson, B.P Lukert. Spinal compression fractures in osteoporotic women: patterns and relationship to hyperkyphosis. *Radiology*. 166 (1988) 497-500.
- [6] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, T. Nakamura, T. Yamamuro. Effects of ions in aqueous media on hydroxyapatite induction by silica gel and its relevance to bioactivity of bioactive glasses and glass-ceramics. *J. Appl. Biomater.* 4 (1993) 221-229.

- [7] D.L. Wheeler, K.E. Stokes, R.G. Hoellrich, D.L. Chamberland, S.W. McLoughlin. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *J. Biomed. Mater. Res.* 41 (1998) 527-533.
- [8] D.C. Greenspan, J.P. Zhong, G.P. La Torre, in Wilson, Hench, Greenspan (Eds.) *The evaluation of surface structure of bioactive glasses in-vitro.. Bioceramics*, vol. 8. Oxford: Pergamon Press, 1995 pp. 89-91.
- [9] H. Oonishi, S. Kushitani, E. Yasukawa, H. Iwaki, L.L. Hench, J. Wilson, E. Tsuji, T. Sugihara. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin. Orth. Rel. Res.* 334 (1997) 316-325.
- [10] J. Moura, L.N. Texeira, C. Ravagnani, O. Peitl, E.D. Zanotto, M.M. Beloti, H. Panzeri, A.L. Rosa, P.T. Oliveira. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). *J. Biomed. Mater. Res. A.* 82 (2007) 545-557.
- [11] A.C. Renno, P.A. McDonnell, N.A. Parizotto, E.L. Laakso. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.* 25 (2007) 275-280.
- [12] E.J. Luger, S. Rochkind, Y. Wollman, G. Kogan, S. Dekel. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg. Med.* 22 (1998) 97-102.
- [13] Y. Ozawa, N. Shimizu, G. Kariya, Y. Abiko. Low-Energy Laser Irradiation Stimulates Bone Nodule Formation at Early Stages of Cell Culture in Rat Calvarial Cells. *Bone.* 22 (1998) 347-354.
- [14] M.A. Trelles, E. Mayayo. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg. Med.* 7 (1987) 36-45.
- [15] A.L. Pinheiro, F.deA. Limeira Júnior, M.E. Gerbi, L.M. Ramalho, C. Marzola, E.A. Ponzi, A.O. Soares, L.C. De Carvalho, H.C. Lima, T.O. Gonçalves. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 21 (2003) 383–388.
- [16] D.N. Kalu. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and mineral.* 15 (1991) 171-192.

- [17] M. Vogel, C. Voigt, U. Gross, C. Müller-Mai. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits, *Biomaterials*. 22 (2001) 357-362.
- [18] E.J.G. Schepers, P. Ducheyne. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J. Oral Rehab*. 24 (1997) 171-181.
- [19] S.R. MacNeill, C.M. Cobb, J.W. Rapley, A.G. Glaros, P. Spencer. In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. *J. Clin. Periodontol*. 26 (1999) 239-245.
- [20] C. Ravagnani. Biosilicato® para promoção da saúde oral. 2003. 161 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2003.
- [21] A. Stein, D. Benayahu, L. Maltz, U. Oron. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed. Laser Surg*. 23 (2005) 161-166.
- [22] U. Comelekoglu, S. Bagis, S. Yalin, O. Ogenler, A. Yildiz, O. Sahin, I. Oguz, R. Hatungil. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin. Rheumatol*. 26 (2007) 380-384.
- [23] V. Shen, R. Birchman, R. Xu, M. Otter, D. Wu, R. Lindsay, D.W. Dempster. Effects of reciprocal treatment with estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest*. 96 (1995) 2331-2338.
- [24] F. Kamali, M. Bayat, G. Torkaman, E. Ebrahimi, M. Salavati. The therapeutic effect of low-level laser on repair of osteochondral defects in rabbit knee. *J. Photochem. Photobiol. B*. 88 (2007) 11-15.
- [25] M. Lind, A. Larsen, C. Clausen, K. Ooster, H. Everland. Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc*. 16 (2008) 690-698.



TABELA 1 – DADOS DESCRITIVOS

Grupo	Rato	Massa da rata na Ovariectomia (g)	Massa da rata na Osteotomia (g)	Massa da rata no Sacrificio (g)	Comprimento Ósseo da tibia (mm)	Profundidade da tibia na região do Calo (mm)
CP	1	245	293	294	38,48	2,97
CP	2	270	337	340	38,96	3,23
CP	3	265	308	306	38,26	3,02
CP	4	230	300	317	41,09	3,61
CP	5	256	282	294	38,36	3,28
CP	6	243	327	320	36,34	2,90
CP	7	247	307	320	38,43	3,12
CP	8	253	300	310	39,80	3,33
CP	9	230	310	293	39,20	3,24
CP	10	251	308	315	38,55	3,20
	Média	249,00	307	311	38,75	3,19
	DP	13,10	15,74	14,84	1,21	0,20
CD	1	260	335	316	39,02	3,24
CD	2	265	322	318	39,27	3,29
CD	3	245	290	288	38,28	2,99
CD	4	250	308	303	39,12	3,00
CD	5	254	316	310	38,80	3,25
CD	6	247	280	278	38,80	3,12
CD	7	250	321	315	39,24	4,19
CD	8	230	310	294	44,46	3,10
CD	9	250	330	333	39,84	3,28
CD	10	231	290	281	38,84	3,65
	Média	248,20	310	304	39,57	3,31
	DP	11,07	18	18	1,77	0,36
B	1	231	300	305	38,70	3,29
B	2	240	300	300	39,10	3,38
B	3	240	310	296	39,06	3,19
B	4	232	290	290	38,38	3,35
B	5	240	300	265	40,02	3,21
B	6	250	320	265	38,20	3,40
B	7	270	317	336	39,62	3,95
B	8	240	329	303	39,26	3,29
B	9	265	330	327	38,89	3,55
B	10	244	310	296	-----	-----
	Média	245,20	311	298	39,03	3,40
	DP	12,98	13	23	0,57	0,23
L60	1	260	332	330	38,48	3,16
L60	2	257	328	317	40,02	2,80
L60	3	260	344	322	39,34	2,94
L60	4	255	315	326	40,04	3,64

Grupo	Rato	Massa da rata na Ovariectomia (g)	Massa da rata na Osteotomia (g)	Massa da rata no Sacrificio (g)	Comprimento Ósseo da tibia (mm)	Profundidade da tibia na região do Calo (mm)
L60	5	258	332	315	39,85	3,32
L60	6	245	310	305	39,82	3,09
L60	7	251	300	310	39,04	3,38
L60	8	250	321	317	40,00	3,01
L60	9	250	340	345	40,66	3,44
L60	10	235	290	310	38,26	3,25
	Média	252,10	321	320	39,55	3,20
	DP	7,78	17	12	0,76	0,25
L120	1	245	334	320	39,09	3,09
L120	2	260	342	328	-----	-----
L120	3	250	345	330	39,27	3,07
L120	4	251	315	315	40,09	3,79
L120	5	250	320	310	38,80	2,95
L120	6	261	336	350	40,01	3,63
L120	7	235	310	285	-----	-----
L120	8	264	320	293	-----	-----
L120	9	235	305	280	39,84	3,16
L120	10	235	285	283	38,34	3,30
	Média	248,60	321	309	39,35	3,28
	DP	11,05	19	24	0,66	0,31
B+L60	1	267	330	340	41,17	3,39
B+L60	2	240	332	334	39,40	3,47
B+L60	3	265	330	339	39,07	3,40
B+L60	4	260	336	344	39,69	3,51
B+L60	5	235	316	314	39,40	3,77
B+L60	6	242	335	320	39,24	3,24
B+L60	7	250	330	310	37,80	3,34
B+L60	8	245	290	290	38,78	3,33
B+L60	9	230	325	330	40,10	3,27
B+L60	10	232	325	340	40,35	3,37
	Média	246,60	324,90	326,10	39,50	3,41
	DP	13,48	13,54	17,31	0,92	0,15
B+L120	1	240	321	300	39,02	3,50
B+L120	2	241	328	315	38,77	3,50
B+L120	3	265	335	325	39,77	3,27
B+L120	4	243	324	320	39,42	3,61
B+L120	5	232	295	295	38,64	3,24
B+L120	6	240	320	322	39,70	3,05
B+L120	7	250	320	325	40,27	3,37
B+L120	8	250	297	305	39,03	3,49
B+L120	9	236	305	305	38,87	3,57
B+L120	10	255	335	335	40,27	4,82
	Média	245,20	318	315	39,38	3,54
	DP	9,83	14,41	12,90	0,60	0,48



TABELA 2 – DADOS BIOMECÂNICOS DO ESTUDO 1

Grupo	Rato	Carga Máxima do Teste de Endentação de 0-0,5mm (KN)	Energia de absorção do Teste de Endentação de 0-0,5mm (J)	Carga Máxima do Teste de Endentação de 0-1,0mm (KN)	Energia de absorção do Teste de Endentação de 0-1,0mm (J)
CP	1	0,07431	0,02592	0,09477	0,06950
CP	2	0,06250	0,02168	0,09117	0,06035
CP	3	0,06787	0,01998	0,09345	0,06182
CP	4	0,04242	0,01154	0,10899	0,04889
CP	5	0,06132	0,02228	0,08137	0,05819
CP	6	0,08489	0,02672	0,08658	0,06535
CP	7	0,02915	0,00936	0,06999	0,03632
CP	8	0,03662	0,01012	0,12258	0,04481
CP	9	0,05554	0,02003	0,10416	0,05795
CP	10	0,05695	0,01799	0,09510	0,05618
	Média	0,05716	0,01856	0,09481	0,05594
	DP	0,01716	0,00627	0,01468	0,00997
CD	1	0,02285	0,00745	0,05431	0,02653
CD	2	0,00969	0,00157	0,04585	0,01304
CD	3	0,01036	0,00291	0,03423	0,01284
CD	4	0,00266	0,00113	0,01764	0,00720
CD	5	0,01871	0,00507	0,05533	0,02013
CD	6	0,05823	0,01756	0,07444	0,04487
CD	7	0,04067	0,00849	0,08467	0,04150
CD	8	0,01026	0,00325	0,02097	0,01074
CD	9	0,01230	0,00357	0,01238	0,00631
CD	10	0,01181	0,00348	0,01463	0,00805
	Média	0,01975	0,00545	0,04144	0,01912
	DP	0,01706	0,00486	0,02568	0,01412
B	1	0,04698	0,00985	0,10255	0,04848
B	2	0,05162	0,01089	0,11173	0,05024
B	3	0,02771	0,00501	0,11238	0,03955
B	4	0,02091	0,00444	0,07656	0,02693
B	5	0,03026	0,00477	0,10030	0,03677
B	6	0,01509	0,00369	0,04942	0,01908
B	7	0,01971	0,00406	0,02996	0,01711
B	8	0,02671	0,00685	0,08540	0,03175
B	9	0,05517	0,01201	0,14277	0,06002
B	10	0,04824	0,01110	0,15409	0,06142
	Média	0,03424	0,00727	0,09652	0,03913
	DP	0,01479	0,00333	0,03823	0,01578
L60	1	0,02899	0,00544	0,05431	0,02704
L60	2	0,01638	0,00383	0,07034	0,02378
L60	3	0,06910	0,01652	0,09409	0,05946
L60	4	0,01028	0,00388	0,02411	0,01151

Grupo	Rato	Carga Máxima do Teste de Endentação de 0-0,5mm (KN)	Energia de absorção do Teste de Endentação de 0-0,5mm (J)	Carga Máxima do Teste de Endentação de 0-1,0mm (KN)	Energia de absorção do Teste de Endentação de 0-1,0mm (J)
L60	5	0,03442	0,00884	0,06440	0,03258
L60	6	0,01651	0,00480	0,04255	0,01909
L60	7	0,01997	0,00626	0,08059	0,02972
L60	8	0,01630	0,00527	0,01630	0,01173
L60	9	0,01683	0,00564	0,04687	0,01984
L60	10	0,03324	0,01005	0,08733	0,03906
	Média	0,02620	0,00705	0,05809	0,02738
	DP	0,01711	0,00388	0,02610	0,01427
L120	1	0,01909	0,00636	0,06462	0,02191
L120	2	-----	-----	-----	-----
L120	3	0,01117	0,00195	0,04124	0,01508
L120	4	0,01340	0,00333	0,02685	0,01322
L120	5	0,02046	0,00563	0,04677	0,02237
L120	6	0,01307	0,00453	0,02134	0,01273
L120	7	-----	-----	-----	-----
L120	8	-----	-----	-----	-----
L120	9	0,00953	0,00163	0,01238	0,00709
L120	10	0,01063	0,00251	0,05968	0,01710
	Média	0,01391	0,00371	0,03898	0,01564
	DP	0,00424	0,00184	0,01965	0,00539
B+L60	1	0,04652	0,01184	0,07426	0,04392
B+L60	2	0,05780	0,01238	0,17600	0,07105
B+L60	3	0,03769	0,00838	0,16709	0,05681
B+L60	4	0,03533	0,00782	0,08722	0,04021
B+L60	5	0,04636	0,00847	0,15098	0,05416
B+L60	6	0,03775	0,00865	0,05656	0,03378
B+L60	7	0,01960	0,00729	0,02387	0,01759
B+L60	8	0,04524	0,00899	0,08268	0,04189
B+L60	9	0,03917	0,00735	0,12435	0,04856
B+L60	10	0,07361	0,01685	0,12864	0,06822
	Média	0,04391	0,00980	0,10716	0,04762
	DP	0,01435	0,00303	0,05009	0,01597
B+L120	1	0,07528	0,01464	0,18352	0,07355
B+L120	2	0,07777	0,01550	0,13632	0,07262
B+L120	3	0,05987	0,01550	0,12478	0,06039
B+L120	4	0,04228	0,01228	0,04945	0,03504
B+L120	5	0,00856	0,00207	0,06379	0,01745
B+L120	6	0,05246	0,01090	0,09122	0,04847
B+L120	7	0,06765	0,01580	0,11860	0,06413
B+L120	8	0,04545	0,01002	0,11570	0,04980
B+L120	9	0,05654	0,01117	0,12231	0,05363
B+L120	10	0,09299	0,01851	0,23168	0,09914
	Média	0,05788	0,01264	0,12374	0,05742
	DP	0,02331	0,00458	0,05338	0,02245



TABELA 3 – DADOS BIOMECÂNICOS DO ESTUDO 2

Grupo	Rato	Carga Máxima do Teste de Endentação de 0-1,5mm (KN)	Energia de absorção do Teste de Endentação de 0-1,5mm (J)	Carga Máxima do Teste de Flexão a Três Pontos (KN)	Energia de absorção do Teste de Flexão a Três Pontos (J)
CP	1	0,23248	0,14435	0,05026	0,02477
CP	2	0,11264	0,10313	0,07729	0,02138
CP	3	0,11699	0,11147	0,06424	0,02390
CP	4	0,13546	0,11109	0,05823	0,02533
CP	5	0,08988	0,09809	0,059866	0,02015
CP	6	0,08658	0,09847	0,01528	0,00387
CP	7	0,07587	0,07267	0,06293	0,02027
CP	8	0,19611	0,12311	0,05028	0,01963
CP	9	0,11979	0,11509	0,06542	0,02153
CP	10	0,12897	0,10863	0,56135	0,02098
	Média	0,12948	0,10861	0,10651	0,02018
	DP	0,04933	0,01849	0,16065	0,00607
CD	1	0,06422	0,05651	0,03042	0,01108
CD	2	0,07337	0,04357	0,08870	0,02599
CD	3	0,07638	0,04111	0,03678	0,00928
CD	4	0,04005	0,02303	0,07358	0,02302
CD	5	0,07971	0,05559	0,09756	0,03915
CD	6	0,10599	0,09117	0,05675	0,01717
CD	7	0,08999	0,08355	0,09557	0,03414
CD	8	0,03860	0,02636	0,05887	0,02013
CD	9	0,03608	0,01898	0,08040	0,02547
CD	10	0,04467	0,02080	0,06862	0,03020
	Média	0,06490	0,04607	0,06872	0,02356
	DP	0,02424	0,02574	0,02319	0,00955
B	1	0,16392	0,11430	0,05608	0,01756
B	2	0,14132	0,11319	0,06489	0,02604
B	3	0,15522	0,10895	0,03815	0,01181
B	4	0,15119	0,08325	0,03753	0,01571
B	5	0,15012	0,10293	0,07624	0,03341
B	6	0,11898	0,06072	0,05750	0,02145
B	7	0,03001	0,03054	0,06851	0,02357
B	8	0,16193	0,09443	0,03659	0,01066
B	9	0,22899	0,15268	0,05168	0,01893
B	10	0,16172	0,13576	-----	-----
	Média	0,14634	0,09967	0,05413	0,01990
	DP	0,04949	0,03528	0,01445	0,00717
L60	1	0,06813	0,05761	0,09922	0,03439
L60	2	0,12639	0,07300	0,03673	0,00876
L60	3	0,09409	0,08091	0,06193	0,02522
L60	4	0,03777	0,02809	0,06891	0,01769

Grupo	Rato	Carga Máxima do Teste de Endentação de 0-1,5mm (KN)	Energia de absorção do Teste de Endentação de 0-1,5mm (J)	Carga Máxima do Teste de Flexão a Três Pontos (KN)	Energia de absorção do Teste de Flexão a Três Pontos (J)
L60	5	0,11270	0,07476	0,07643	0,02947
L60	6	0,07411	0,04973	0,07697	0,02842
L60	7	0,13211	0,07846	0,07447	0,04167
L60	8	0,03630	0,02513	0,06314	0,01583
L60	9	0,05769	0,04718	0,10583	0,04418
L60	10	0,10991	0,08856	0,07428	0,027354
	Média	0,08492	0,06034	0,07379	0,02730
	DP	0,03520	0,02233	0,01927	0,01116
L120	1	0,12295	0,06648	0,05659	0,01567
L120	2	-----	-----	-----	-----
L120	3	0,06642	0,04457	0,08792	0,03070
L120	4	0,04889	0,03122	0,08054	0,03366
L120	5	0,08965	0,05118	0,06714	0,02051
L120	6	0,04524	0,02328	0,07157	0,02480
L120	7	-----	-----	-----	-----
L120	8	-----	-----	-----	-----
L120	9	0,03361	0,01405	0,05015	0,01353
L120	10	0,16306	0,07114	0,03246	0,00901
	Média	0,08140	0,04313	0,06377	0,02113
	DP	0,04715	0,02152	0,01895	0,00910
B+L60	1	0,08180	0,08132	0,03125	0,007733
B+L60	2	0,20470	0,16534	0,02805	0,01420
B+L60	3	0,22242	0,15817	0,02948	0,01721
B+L60	4	0,12827	0,09298	0,06591	0,02662
B+L60	5	0,22671	0,15403	0,05023	0,02156
B+L60	6	0,05656	0,05810	0,07358	0,02558
B+L60	7	0,04419	0,03599	0,06456	0,02281
B+L60	8	0,12845	0,09446	0,05442	0,02234
B+L60	9	0,13724	0,11243	0,08193	0,03105
B+L60	10	0,15012	0,14003	0,03587	0,01681
	Média	0,13804	0,10928	0,05153	0,02059
	DP	0,06529	0,04441	0,01970	0,00676
B+L120	1	0,20228	0,16242	0,02115	0,01481
B+L120	2	0,27101	0,16594	0,04822	0,01809
B+L120	3	0,18964	0,14176	0,04609	0,01919
B+L120	4	0,07992	0,06462	0,07098	0,01800
B+L120	5	0,16961	0,07276	0,02703	0,00822
B+L120	6	0,11528	0,09803	0,02910	0,00425
B+L120	7	0,19087	0,13637	0,06744	0,02317
B+L120	8	0,20134	0,12972	0,03023	0,00836
B+L120	9	0,20148	0,13646	0,01654	0,00404
B+L120	10	0,25436	0,21125	0,04164	0,02692
	Média	0,18758	0,13193	0,03984	0,01451
	DP	0,05694	0,04435	0,01858	0,00795



**ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

---

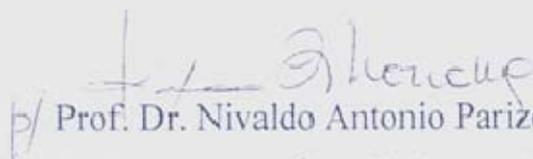
## Parecer 023/2006

Protocolo nº 025/2006

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CCEA/UFSCar, durante sua 9ª. Reunião concluiu a apreciação ética do projeto de pesquisa “Análise dos efeitos do biosilicato e do laser de baixa intensidade no processo de consolidação de defeitos ósseos em tecido ósseo saudável e osteopênico: Projeto Multidisciplinar” elaborado do por Nivaldo Antonio Parizotto.

Conclusão: Projeto Aprovado.

São Carlos, 21 de novembro de 2006.

  
p/ Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto  
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal